

## DOSAGE D'ANTICORPS PAR L'UTILISATION DU TEST ELISA

Après une vaccination, l'organisme réagit par la production d'anticorps dirigés contre l'antigène injecté. Une mémoire immunitaire se met en place et lors d'un second contact avec l'antigène, la réaction sera beaucoup plus rapide et plus importante. Des dosages d'anticorps peuvent être réalisés par l'utilisation du test ELISA : si la quantité d'anticorps détectés dans le sérum est sous un certain seuil, on renouvellera la vaccination.

**On cherche à déterminer si un individu doit être ou non, de nouveau vacciné.**

<u>Matériel</u>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- une barrette de 8 puits au fond desquels sont fixés des antigènes correspondant à ceux injectés lors de la vaccination</li> <li>- 7 solutions d'anticorps Ac1 de concentrations différentes appelées C1,C2,C3,C4,C5,C6 et C7</li> <li>- eau distillée, papier filtre, cuvette ou évier à proximité, micropipettes (ou équivalent), gants, un feutre effaçable, un chronomètre</li> <li>- sérum S de l'individu à tester</li> <li>- solution d'anticorps conjugués Ac2 = complexe entre anticorps et enzyme</li> <li>- solution de lavage ( tampon PBS tween)</li> <li>- solution de substrat de l'enzyme peroxydase = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (l'action de l'enzyme sur ce substrat se traduit par une coloration)</li> </ul>

Activités et déroulement des activités	Capacités et principaux critères d'évaluation	Barème
1. A l'aide de la fiche document – candidat, présentant le principe du test ELISA, <b>expliquer</b> , l'intérêt d'avoir des solutions d'anticorps à différentes concentrations connues.	<b>Comprendre la manipulation</b>	3
2. <b>Mettre en œuvre</b> le protocole fourni en suivant les indications de la fiche technique. <b>Appeler l'examineur pour présenter votre manipulation</b> <u>Préparer la question 3 pendant les temps d'attente.</u> <b>Appeler ensuite l'examineur pour vérifier les résultats et obtenir éventuellement un document de secours</b>	<b>Réaliser une manipulation d'après un protocole</b> respect des étapes du protocole utilisation maîtrisée du matériel organisation de la paillasse	8
3. <b>Schématiser</b> les molécules présentes en fin de test dans le puits H (résultat de l'individu testé) et celles présentes dans le puits A. Ces schémas respecteront les modèles de la fiche document et montreront les associations moléculaires.	<b>Traduire des informations par un schéma</b>	6
4. <b>Utiliser</b> les résultats obtenus (ou indiqués sur le document de secours) et la fiche document - candidat, pour déterminer si l'individu doit être ou non, de nouveau vacciné.	<b>Appliquer une démarche explicative</b>	2
5. <b>Ranger</b> le poste de travail	<b>Gérer et organiser le poste de travail</b>	1

## DOSAGE D'ANTICORPS PAR L'UTILISATION DU TEST ELISA

### Principe du test de détection d'anticorps

Un sérum contaminé contient des anticorps Ac1 spécifiques de l'antigène.

Si ces anticorps sont effectivement présents dans le sérum, ils reconnaissent l'antigène fixé au fond du puits.

Les anticorps Ac2 sont spécifiques des anticorps Ac1 ; dans le protocole du test ELISA, ils sont fixés à une enzyme : la peroxydase.

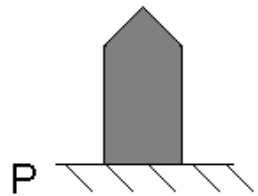
Cette enzyme catalyse une réaction colorée en présence d'un substrat incolore.

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration d'anticorps à doser : plus la concentration d'anticorps est élevée, plus la coloration est intense.

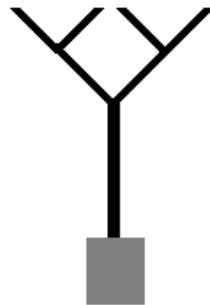
Le **seuil** en dessous duquel l'individu est considéré comme non immunisé est dans notre exemple une concentration de **1,06  $\mu\text{g d'Ac.mL}^{-1}$** .

Concentration en $\mu\text{g d'Ac.mL}^{-1}$	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
	17,00	8,50	4,25	2,12	1,06	0,53	0,26

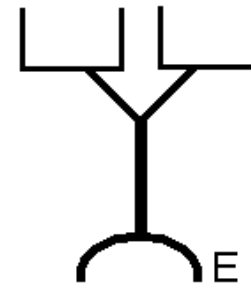
Planche de schémas permettant la réalisation du schéma explicatif à l'échelle moléculaire :



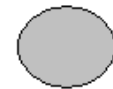
Antigène fixé au fond  
du puits P



Ac1 : anticorps spécifique  
de l'antigène



Ac2 : Anticorps conjugué, associé  
à l'enzyme peroxydase E



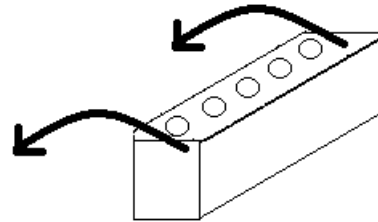
Substrat  
de l'enzyme

**DOSAGE D'ANTICORPS PAR L'UTILISATION DU TEST ELISA****PROTOCOLE**

- 1- **Organiser** votre plan de travail pour manipuler proprement.
- 2- L'encoche de la barrette du puits permet de répéter le puits A ou bien vous pouvez le marquer.
- 3- **Déposer 4** gouttes ou 160  $\mu\text{L}$  :
  - de C1 dans le puits A, C2 dans le puits B, etc., jusqu'à C7 dans le puits G.
  - du sérum S de l'individu, de concentration inconnue, dans le puits H.Attention, une seule solution par puits.

4- **Laisser incuber** 15 min à température ambiante.

- 5- **Vider** la barrette en la renversant d'un geste rapide au-dessus de l'évier de manière à éviter le mélange des produits. **Tamponner** ensuite les puits sur du papier filtre pour éliminer l'excès de produits et éviter la contamination.



- 6- **Laver** les puits : **remplir** tous les puits avec la solution de lavage (tampon PBS tween) et vider immédiatement comme précédemment. **Répéter** 2 fois ce lavage.
- 7- **Mettre** dans les puits 4 gouttes ou 160  $\mu\text{L}$  de la solution de conjugué Ac2 sur lequel est fixée l'enzyme peroxydase.
- 8- **Laisser** incuber 15 minutes.
- 9- **Vider** les puits et les **laver** 2 fois comme à l'étape 4.
- 10- **Mettre** dans les puits 4 gouttes de substrat de l'enzyme peroxydase. Une coloration se développe. Ne pas attendre pour comparer les colorations car au bout de quelques minutes les différences s'estompent.

**DOSAGE D'ANTICORPS PAR L'UTILISATION DU TEST ELISA**

ETABLISSEMENT :

Classe :

Nom - Prénom :

A rendre à l'issue de l'épreuve - utiliser le verso si nécessaire

**DOSAGE D'ANTICORPS PAR L'UTILISATION DU TEST ELISA**

Capacités et critères d'évaluation (en gras, évaluation pendant la séance )	Barème	Nom des candidats			
1- Comprendre la manipulation - Les solutions de concentration connue sont les témoins permettant, par comparaison, d'établir la concentration inconnue d'une solution et déterminer ainsi la nécessité d'une nouvelle vaccination.	3				
<b>2- Réaliser une manipulation d'après un protocole</b> - <b>respect des différentes étapes du protocole</b> - <b>utilisation maîtrisée du matériel</b> - <b>repérage des puits (C1 correspondant à A ou marqué)</b> - <b>résultats : coloration cohérente des puits en fonction de la concentration</b>	<b>3</b> <b>2</b> <b>2</b> <b>1</b>				
3- Traduire des informations par un schéma - respect des modèles proposés - associations moléculaires correctes - cohérence entre la concentration en anticorps Ac1 et la coloration (moins d'Ac1 représentés dans le puits H, quantité en cohérence avec la concentration de la solution fournie) - légendes correctes, titre adapté, valeur de la concentration indiquée	3 3				
4- - Appliquer une démarche explicative - cohérence de la déduction avec les résultats	2				
<b>5 - Organisation de la paillasse et rangement du matériel en fin de manipulation</b>	<b>1</b>				
Note	/ 20				

## DOSAGE D'ANTICORPS PAR L'UTILISATION DU TEST ELISA

### Matériel

- une barrette de 8 puits au fond desquels sont fixés des antigènes correspondant à ceux injectés
- 7 solutions d'anticorps Ac1 de concentrations différentes appelées C1,C2,C3,C4,C5,C6 et C7
- eau distillée, papier filtre, cuvette ou évier à proximité, micropipettes (ou équivalent), gants, un feutre effaçable, un chronomètre.
- sérum S de l'individu à tester
- solution d'anticorps conjugués Ac2 = complexe entre anticorps et enzyme
- solution de lavage ( tampon PBS tween)
- solution de substrat de l'enzyme peroxydase = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (l'action de l'enzyme sur ce substrat se traduit par une coloration)

### **Préparation :**

- kit test ELISA dosage d'anti-BSA SORDALAB ou kit APBG
- Réserver quelques barrettes de secours
- Il est conseillé d'utiliser une micropipette pour la précision des prélèvements.
- Préparer les solutions de concentration différente suivant les indications des fournisseurs. Il faut adapter la taille des tubes à la pipette choisie.
- Fournir seulement une barrette de huit puits au candidat.
- Suivant les groupes, on pourra changer la concentration du sérum à tester et varier ainsi les résultats. Cependant la concentration choisie ne devra entraîner aucune ambiguïté dans la réponse. Il est donc conseillé de fournir soit une concentration sans anticorps comme C7 soit une solution très concentrée comme C2.

### **A l'attention de l'évaluateur :**

- deux documents de secours par kit sont fournis : concentration au dessus du seuil et concentration en dessous du seuil. Affichage possible à l'écran : [07\\_I7\\_B\\_Pro\\_04\\_sec1](#) ou [07\\_I7\\_B\\_Pro\\_04\\_sec2](#) ou [07\\_I7\\_B\\_Pro\\_04\\_sec3](#) ou [07\\_I7\\_B\\_Pro\\_04\\_sec4](#)

- question 2 : l'examineur demande au candidat ce qu'il a effectivement mis en oeuvre (solution choisie pour chaque puits, doses utilisées...).

Pour la réalisation de la manipulation :

- Les 9 points de la réalisation de la manipulation ne pourront être attribués que si le candidat a correctement repéré les puits et déposé les produits.
- Si le repérage et le dépôt des produits sont mal réalisés, le candidat ne pourra pas obtenir plus de 4 points.
- Le document de secours est distribué pour la poursuite de l'épreuve.

Prescriptions			Autorisations	
Blouse	Gants	Lunettes	Calculatrice	Papier brouillon
Oui, non fournie	Oui, fournis	non	non	Fourni par l'établissement

**DOSAGE D'ANTICORPS PAR L'UTILISATION DU TEST ELISA**

**RESULTATS OBTENUS**



**DOSAGE D'ANTICORPS PAR L'UTILISATION DU TEST ELISA**

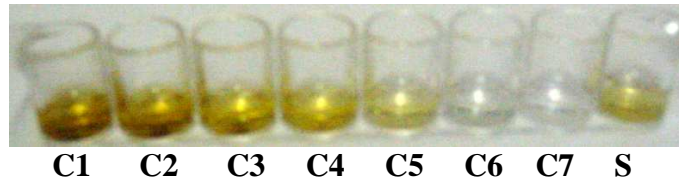
**RESULTATS OBTENUS**





**DOSAGE D'ANTICORPS PAR L'UTILISATION DU TEST ELISA**

**RESULTATS OBTENUS**



**DOSAGE D'ANTICORPS PAR L'UTILISATION DU TEST ELISA**

**RESULTATS OBTENUS**



**C1 C2 C3 C4 C5 C6 C7 S**