

**Situation initiale :**

On s'intéresse à un homme qui se présente aux urgences car il vient de se blesser à la main en jardinant. La plaie est profonde et souillée de terre. Le médecin envisage un risque de tétanos. C'est une maladie souvent mortelle, due à une **toxine tétanique** produite par une bactérie ***Clostridium tetani*** vivant dans le sol et capable de pénétrer dans l'organisme au niveau d'une plaie. La maladie se manifeste par des spasmes, des contractures musculaires intenses et des convulsions. L'atteinte des muscles respiratoires peut entraîner le décès par asphyxie. Le patient a été vacciné dans son enfance mais n'a pas eu de rappel depuis plus de 20 ans.

Après une primovaccination, des rappels tous les 10 ans sont recommandés.

Un sujet est considéré comme protégé contre le tétanos lorsque son taux d'anticorps est  $\geq 0,1$  UI par ml (UI=Unité internationale : unité de mesure de la quantité d'une substance basée sur l'activité biologique de la substance)

**Problème : Ce patient est-il encore immunisé ou doit-il faire un rappel vaccinal ?**

**Objectif :** On cherche à réaliser un **sérodiagnostic** chez ce patient : il s'agit de détecter la présence d'anticorps anti-tétanos dans son sérum et de les doser à l'aide du **test ELISA**

**Matériel à disposition :**

- Sérum X de l'individu à tester
- Sérum témoin T d'un individu qui n'est plus immunisé
- 6 solutions d'anticorps anti-toxine tétanique de concentrations différentes et connues C1 à C6

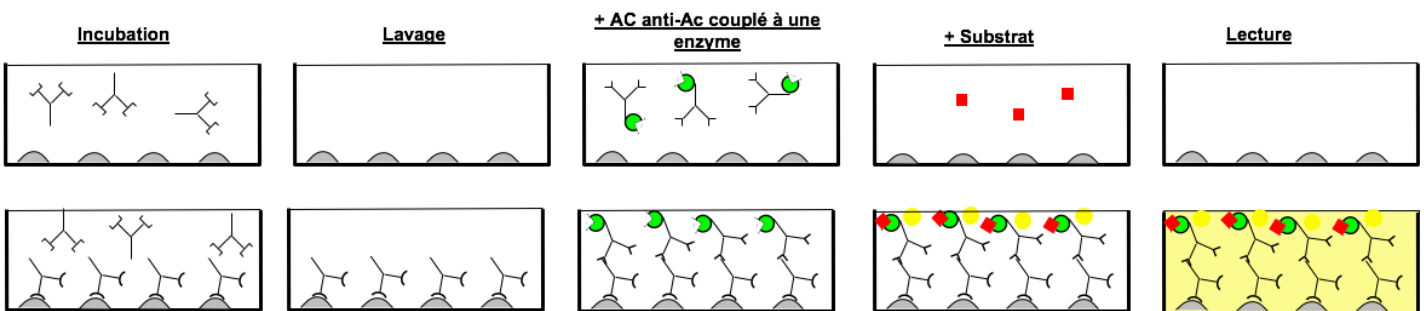
	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub> = C <sub>1</sub> /2	C <sub>3</sub> = C <sub>1</sub> /4	C <sub>4</sub> = C <sub>1</sub> /8	C <sub>5</sub> = C <sub>1</sub> /32	C <sub>6</sub> = C <sub>1</sub> /128
Concentration d'anticorps (UI / ml)	0,4	0,2	0,1	0,05	0,012	0,003

**PRINCIPE du test ELISA**

Le test ELISA permet de déterminer la présence d'anticorps spécifiques d'un antigène donné dans un sérum. Les antigènes contre lesquels les anticorps sont dirigés sont disposés au fond d'un puits (alvéole). Le sérum testé est ensuite déposé dans le puits. Si les Ac recherchés sont effectivement présents dans le sérum, ils reconnaissent les antigènes et restent fixés dessus. Un premier lavage est effectué pour éliminer les éventuels Ac non liés. Une solution d'Ac anti-anticorps recherchés est déposée ensuite dans le puits. Ces anticorps traceurs sont fixés à une enzyme qui transforme un substrat incolore en produit coloré (bleu). Si les anticorps recherchés sont effectivement présents dans le sérum, les Ac traceurs restent fixés dessus. Un deuxième lavage permet d'éliminer les Ac traceurs non fixés. On ajoute enfin le substrat incolore qui se colore en bleu si l'enzyme est présente.

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration d'anticorps présents : plus la concentration d'anticorps est élevée, plus la coloration (bleue) est intense.

Haut = témoin  
Bas = séropositif



**Légendes :**

Puits de la plaque de micro-titration							
	Antigène	Ac spécifique de l'Antigène	Ac non spécifique de l'Antigène	Ac anti Ac couplé à une enzyme	Substrat	Enzyme	Produit coloré

### Matériel :

- une barrette de 8 puits au fond desquels sont fixés des toxines tétaniques (Ag)
- divers sérums : de monsieur X et d'un témoin T qui n'est plus immunisé et des solutions contenant des doses d'Ac connues et décroissantes.
- de l'eau distillée
- une solution d'Ac traceurs = complexe entre un anticorps anti-anticorps associé à l'enzyme peroxydase
- une solution de lavage PBS-tween
- une solution de substrat TMB de l'enzyme peroxydase : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- une micropipette (avec cônes)

1) **Remplir** les puits et les marquer au stylo

Puit 1 : 80 µL de solution de concentration connue C1

Puit 2 : 80 µL de solution de concentration connue C2

Puit 3 : 80 µL de solution de concentration connue C3

Puit 4 : 80 µL de solution de concentration connue C4

Puit 5 : 80 µL de solution de concentration connue C5

Puit 6 : 80 µL de solution de concentration connue C6

Puit 7 : 80 µL de sérum d'un témoin qui n'est plus immunisé : témoin négatif

Puit 8 : 80 µL de sérum de monsieur X à tester

2) Laisser **incuber** 10 minutes à température ambiante

3) **Vider** la barrette : la renverser d'un geste énergique au-dessus de l'évier puis la tamponner sur du papier filtre pour éliminer les restes de produits et éviter la contamination entre puits

4) Réaliser **3 lavages successifs** :

- remplir délicatement au compte-gouttes tous les puits au ¾ (ne pas déborder) avec la solution de lavage PBS-Tween

- vider énergiquement au-dessus de l'évier

- tamponner comme précédemment

5) Ajouter dans tous les puits : 80 µL de solution **d'Ac-traceurs** et laisser **incuber** 15 minutes

6) **Vider** la barrette par retournement (même méthode qu'à l'étape 3)

7) Réaliser **3 lavages successifs**

8) Ajouter 80 µL de **solution de substrat TMB** dans tous les puits : attendre 5 minutes qu'une coloration apparaisse ou non (ne pas attendre trop longtemps pour prendre une photo et comparer car les différences s'estompent au cours du temps)

Compte-rendu attendu :

- Photographie légendée et titrée des résultats
- Exploitation des résultats et réponse au problème posé