TP 14
Techniques d'immunofluorescence.

Dépistage immunologique de la toxoplasmose par IFI

Les objectifs de cette séance :

Réaliser une technique IFI.

Manipuler un microscope à épifluorescence.

Apprendre à manipuler des produits sanguins.

Les analyses à réaliser :

Analyser deux sérums.

Le travail à rendre :

La fiche résultat.

Un compte rendu sur la toxoplasmose.

I Généralités sur le titrage des Immunoglobulines

I.1 Principe

Il s'agit d'une recherche d'Ac antitoxoplasmique en utilisant comme Ag le toxoplasme entier formolé et fixé par la chaleur sur des lames.
Si le sérum à tester contient des Ac spécifiques, ceux-ci s'unissent aux Ag et sont donc retenus à la surface.
Après lavage, on peut, pour réveler les immuns-complexes (toxoplasmes-Ac antitoxoplasmes) utiliser :

Soit des antiglobulines fluorescentes anti-IgG : Détection uniquement des IgG antitoxoplasmiques.
Soit des antiglobulines fluorescentes anti-IgM : Détection uniquement des IgM antitoxoplasmiques.
Soit des antiglobulines fluorescentes anti-immunoglobulines totales: Détection uniquement des IgM + IgG antitoxoplasmiques.

I.2 Réactifs

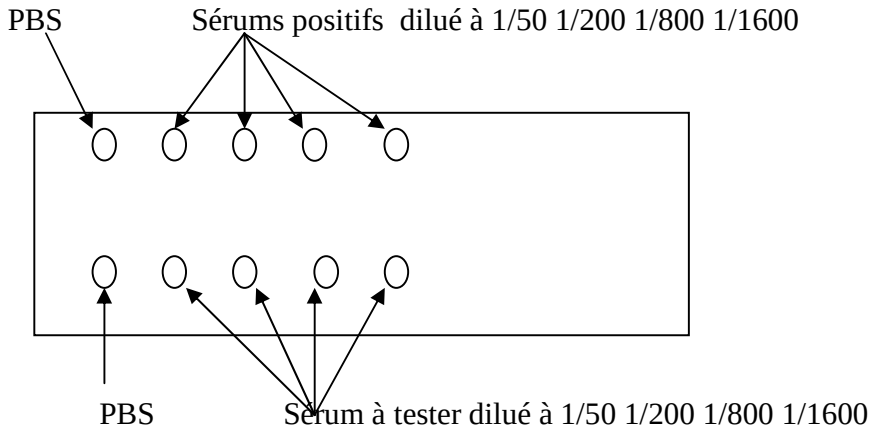
Lames de verres porteuses d'Ag toxoplasmiques prêtes à l'emploi : Toxo-spot IF
Tampon PBS, pH=7.2
Bleu d'evans à1%
Fluoprep : milieu de montage pour IF
Fluoline G
Fluoline M
Toxotrol F : sérum positif de contrôle.
Sérum à tester

II Manipulation.

Ouvrir 4 lames par binôme et laisser à température ambiant pendant 15 minutes.
Analyser 2 sérums.
Voir enseignant pour explications.
Avant utilisation regarder les lames en lumière blanche.

2* Dépôts des sérums : 20 µL /cercle. En respectant la gamme de dilution. Cf schéma si dessous.

Faire des dilutions pour des volumes finaux de 400µL. Préparer des dilutions en cascade.
Faire vérifier par l'enseignant les calculs de dilutions.
Les préparations des dilutions sont faites dans des tubes Ependorf. (10 tubes)



3* Incuber 30 minutes, en chambre humide, à 37°C, à l'obscurité.

Préparer un plateau, avec du papier absorbant humide.

4* Rincer délicatement avec du tampon en utilisant une pastette.
Rincer par immersion.
(5 minutes dans le PBS (faire 2 bains et changer le PBS).
Attention voir l'enseignant pour cette manipulation.

5* Préparer les conjugués. Attention.

Diluer la Fuoline G et la Fluoline M dans du PBS contenant du bleu d'Evans.
=> 2 solutions à préparer
Dans un tube à hémolyse :
5ml de PBS
1 goutte de bleu d'Evans
4 gouttes de Fluoline. Soit G soit M.
Bien mélanger

6* Recouvrir chaque cercle de 20 µL de conjugué.

Voir enseignant pour la distribution des conjugués.

7* Incuber 30 minutes, en chambre humide, à 37°C, à l'obscurité.

Préparer un plateau, avec du papier absorbant humide

8* Rincer délicatement avec du tampon en utilisant une pastette.
Rincer par immersion.
(5 minutes dans le PBS (faire 2 bains et changer le PBS).
Attention voir l'enseignant pour cette manipulation.

9*Laisser sécher en plaçant les lames droites.

10* Déposer 4 gouttes de Fluoprep et recouvrir astucieusement par 2 lamelles de 32 ou une lamelle de 64 mm.

11* Faire la lecture/
Attention à la lumière UV ; ne pas regarder…

III Lecture des résultats

Avant de lire, vérifier l'absence de fluorescence du témoin conjugué. Une coloration rouge est liée à la présence du bleu d'Evans. Si le témoin conjugué présente une fluorescence, la série ne doit pas être validée et les échantillons devront être testés dans une autre série.

Réaction positive : Fluorescence verte périphérique autour des toxoplasmes.

Réaction négative : Pas de fluorescence verte. Une coloration rouge est liée à la présence du bleu d'Evans.

Si on a la présence d'une fluorescence verte. Présence d'anticorps anti-toxoplasme dans le sérum.
Contamination ancienne ou évolutive. => A expliquer…

Il faut réaliser un 2ème test quantitatif à 3 semaines d'intervalle

III.1 Détermination du titre. Test quantitatif.

En vous référent à la dilution, vous déterminer le titre qui correspond à l'inverse de la dilution.

IgG : réaction positive à partir de 10 UI.

Titre échantillon=

(Titre du Toxotrol* dernière dilution positive de l'échantillon)

Dernière dilution positive du Toxotrol.

III.2 Titrage des IgM. Suivre le même protocole que précédemment

La mise en évidence d'lgM, si elle évoque une infection récente, n'est pas suffisante pour l'affirmer. Des IgM non spécifiques peuvent interférer dans les réactions sérologiques (facteurs rDumatoïdes, IgM "naturelles"). La présence d'lgM n'a de signification que si leur taux est élevé et doit être interprétée en fonction des IgG. On ne peut conclure, en effet, à une séroconversion toxoplasmique que lorsque des anticorps IgG sont détectés associés aux IgM, jamais sur la seule présence d'lgM.

De plus, des IgM résiduelles sont fréquemment détectées un an après la contamination avec des techniques très sensibles (immunocapture: ELISA ou ISAGA) Il est alors utile de comparer les résultats d'lgM obtenus par ces techniques avec ceux obtenus en immunofluorescence (test de Remington), rarement décelables plus de trois mois après leur apparition.

L'utilisation combinée de ces techniques permet, dans certaines conditions, de donner un avis sur un seul prélèvement. La détection des autres isotypes (IgA et IgE) peut compléter ce diagnostic sérologique lors de la phase évolutive.

Dans certains cas, des difficultés persistent dans l'interprétation du sérodiagnostic de la toxoplasmose. Dans ces situations diagnostiques difficiles, seules une détection des divers isotypes avec utilisation d'antigènes de référence permettra d'apprécier dans sa globalité la réponse immunitaire humorale. Dans ces conditions, le biologiste peut établir la date probable de contamination avec une précision suffisante (15 jours).

IV Conclure sur la contamination des sérums.

Voir l'enseignant pour le calcul

Fiche résultats

A travailler
A expliquer
A comprendre

○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○
○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○