

ORGANISATION DE COORDINATION
ET DE COOPERATION POUR LA LUTTE
CONTRE LES GRANDES ENDEMIES

CENTRE MURAZ
LABORATOIRE DES SCHISTOSOMIASES

N° 7 / PARA. 79

MISSION O.R.S.T.O.M.
AUPRES DE L'O.C.C.G.E.

N° 7.098 / Doc. Tech. OCCGE

ELISA EN MICRO METHODE DANS LE DEPISTAGE
IMMUNOLOGIQUE DE LA SCHISTOSOMIASE MANSONIENNE

I Modalité Technique (1)

BOUDIN C*

26 DEC. 1984

O.R.S.T.O.M. Fonds Documentaire

N° : 46.366

Cote : B

141

- (1) Ce rapport présente les résultats de recherches menées par le
Laboratoire des Schistosomiasés Section Parasitologie du Centre Muraz
OCCGE, dans le cadre d'accords conclus entre l'OCCGE et l'ORSTOM.

- 8 AOUT 1979

O. R. S. T. O. M.

Collection de Référence

* Parasitologiste de l'O.R.S.T.O.M. Centre Muraz.

O.D.

n° 9813 Ent. Red

L'ELISA en micro-méthode dans le dépistage immunologique
de la schistosomiase mansonienne

I. Modalités techniques.

I. INTRODUCTION :

Il est intéressant de disposer d'une technique de dépistage immunologique des bilharzioses, applicable en médecine de masse et donnant des résultats plus fiables que les techniques parasitologiques des selles actuellement employées.

Notre choix s'est fixé sur la technique de l'ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Elle a pour principaux avantages sur les autres méthodes immunologiques ;

- une grande sensibilité,
- une diminution du coût du matériel,
- une consommation faible d'antigène et de sérum,
- une réalisation simple à partir de prélèvements sanguins faits sur confetti,
- enfin, la possibilité d'être réalisée en grande série.

II. PRINCIPE DE L'ELISA :

L'ELISA est une méthode immunoenzymatique qui a été décrite pour la première fois ^{par} Engvall et Perlman en 1972 (1). Le principe est original :

L'antigène (Ag) est fixé (adsorbé) spontanément sur les parois des tubes de polystyrène. Après lavage pour éliminer l'excès d'Ag non adsorbé, on ajoute le sérum du sujet contenant des Ac spécifiques contre l'Ag bilharzien. Ces Ac se fixent sur l'Ag adsorbé sur les parois des tubes. Un deuxième lavage élimine l'excès d'Ac non fixés. Dans un troisième temps, on ajoute un conjugué d'immunoglobulines anti-humaines de mouton, marquées à la peroxydase. Ces immunoglobulines de mouton vont se fixer sur les Ac humains donc sur le complexe Ag-Ac adsorbé. Un troisième lavage permet l'élimination des immunoglobulines non fixées.

La mise en évidence de la fixation du conjugué sur le complexe Ag-Ac se fait par une réaction enzymatique colorimétrique. On utilise l'eau oxygénée comme substrat et l'orthodianisidine comme donneur d'hydrogène. L'activité peroxydasique est révélée par la réaction cyto-chimique de Graham et Karnowsky (2). La peroxydase agit sur l'eau oxygénée en libérant l'oxygène qui active l'orthodianisidine. Le composé oxydé se colore en brun jaune. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de peroxydase fixée, donc à la quantité d'Ac fixés. Un sérum de sujet non bilharzien ne donne aucune coloration.

III. MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE :

Au cours de nos expérimentations, nous avons étudié différentes techniques d'adsorption de l'Ag sur les parois de polystyrène, afin de pouvoir utiliser la plus faible dilution antigénique, tout en obtenant une coloration franche.

D'autre part nous avons recherché la dilution optimale Ag/Ac donnant le meilleur contraste entre positif (+) et négatif (-). Enfin nous avons essayé de réduire les différents temps de contact lors de la réaction.

1. Adsorption de l'Ag :

Nous avons fait varier un grand nombre de paramètres : tampon de dilution, temps de contact, température, présence ou non de glutaral déhyde et types de plaques. Les différentes combinaisons sont résumées dans le tableau I.

Tableau I.

Tampon PBS-Azid	Tampon carbonate pH9,6
Glutaraldéhyde (+)	Glutaraldéhyde (+)
25° une nuit	25° une nuit
25° 3h	25° 3h
37° une nuit	37° une nuit
37° 3h	37° 3h
56° 2h	56° 2h
56° 1h + agitation	56° 1h + agitation
Glutaraldéhyde (-)	Glutaraldéhyde (-)
25° une nuit	25° une nuit
25° 3h	25° 3h
37° une nuit	37° une nuit
37° 3h	37° 3h
56° 2h	56° 2h

1.1. Utilisation de la glutaraldéhyde :

Nous avons utilisé deux techniques de fixation en présence de glutaraldéhyde :

- soit en utilisant des plaques traitées à la glutaraldéhyde 1 % en eau distillée juste avant usage, pendant 1h à 4°, puis bien lavées avant la fixation de l'Ag,
- soit en associant la glutaraldéhyde 1 % à la solution antigénique.

L'utilisation de la glutaraldéhyde entraîne une fixation non spécifique des Ac et de l'immunoglobuline marquée sur les parois de polystyrène. Ce qui fait que la coloration est très intense même avec des sérums négatifs (voir courbe A). Nous avons abandonné cette méthode de fixation.

1.2. Temps d'adsorption :

En faisant varier les temps de contact de la solution d'Ag avec les parois de polystyrène, nous nous sommes rendu compte que la durée optimale était de une nuit (12 heures) (voir courbe B).

1.3. Variation des tampons de dilutions :

Nous avons utilisé deux tampons classiques : le PBS + Azid de Na (voir formule dans les réactifs) et le tampon carbonate pH 9,6 (voir réactifs).

La meilleure adsorption est obtenue avec le tampon carbonate (v. courbe C)

1.4. Variation de la température d'adsorption :

Nous avons fait varier la température au cours de l'adsorption antigénique, de 25° à 56° en passant par 37°. Comme l'illustre la courbe B, c'est à 37° que l'adsorption se fait le mieux. Nous bloquons ensuite la réaction en stockant les plaques adsorbées à +4°. Le temps de conservation est d'environ 10 jours.

1.5. Types de plaques utilisées :

Afin de limiter les quantités de tampon, de sérum et d'Ag utilisées nous avons préféré travailler sur des plaques de microtitration en polystyrène plutôt que sur des tubes. Nous avons testé plusieurs plaques : les plaques en V n'ont pas une contenance suffisante, les plaques à fond plat donnent de moins bons résultats que les plaques à fond en U.

Finalement nous avons opté pour les plaques "Microtiter" M 24A à fond en U.

Nous avons retenu comme meilleure combinaison : une fixation de l'Ag en tampon carbonate à 37° une nuit, sur des plaques "Microtiter" en polystyrène à fond en U.

2. Dilution optimale Ag/Ac :

Pour chaque réaction Ag/Ac, il existe une dilution donnant une réaction optimale.

Nous avons testé des dilutions ^{Dé}croissantes d'Ag (10,9,8,7,6,5,4,3,2 micro-grammes d'Ag lyophilisé/ml) vis à vis de dilutions croissantes de sérum : de 1/5ème à 1/10240ème en progression géométrique de raison 2. Nous avons obtenu une courbe sinusoidale (voir courbe D1) avec une chute brutale des densités optiques pour des dilutions comprises entre 1/80ème et 1/1280ème. C'est dans cette zone que nous avons ensuite cherché la dilution optimale Ag/Ac en réalisant des dilutions sériques de 1/125, 1/200, 1/250, 1/300, 1/400, 1/500, 1/600, 1/800, 1/1000 et 1/2000. Les résultats sont illustrés par la courbe D2.

Nous avons finalement retenu une dilution antigénique de 5 micro-grammes d'Ag/ml pour une dilution sérique de 1/125. A la dilution classique 5 micro-grammes d'Ag pour une dilution sérique de 1/500, nous obtenons un certain nombre de sérums faiblement titrés, faussement négatifs. Aussi avons nous préféré accroître la sensibilité de la réaction au détriment éventuel de la spécificité, en diminuant la dilution sérique.

3. Temps de contact sérum/antigène :

Dans le but de raccourcir la durée de la manipulation, nous avons essayé de réduire le temps de contact Ag/Ac qui est classiquement de 3 heures à la température du laboratoire.

Les combinaisons durée-température ont été les suivantes : 3 heures à 25°, 2 heures à 25°, 2 heures à 37°, 1 heure à 37° avec agitation (courbe E).

Le meilleur résultat est obtenu pour un contact Ag/Ac de 3 heures à la température du laboratoire.

Les températures supérieures semblent inhiber la réaction et l'agitation semble décrocher les molécules adsorbées sur les parois de polystyrène.

4. Dilution optimale du conjugué :

Dans le but d'abaisser le coût de la réaction, nous avons testé des dilutions croissantes de conjugué (1/500, 1/1000, 1/1500, 1/2000, 1/2500 et 1/5000). De bons résultats, même pour des sérums faiblement titrés sont obtenus pour des dilution au 1/2000ème (courbe F.).

5. Temps de contact conjugué/Complexe antigène-anticorps

Habituellement le temps de contact est de 3 heures à 25°. Nous avons essayé de raccourcir la durée de contact (courbe E). Notre expérimentation confirme la supériorité de la durée classique. (3 heures à 25°).

6. Cinétique de la coloration :

La réaction de coloration étant une réaction enzymatique, il était important de savoir à quel moment la cinétique de la réaction atteignait son maximum. Nous avons enregistré les DO toutes les 10 minutes au cours de la réaction de révélation. L'intensité de la coloration passe par un maximum entre 50 et 60 minutes, puis décroît (courbe G). Nous devons donc stopper la réaction à son maximum d'intensité. (60') par 25 micro-litre d'HCl 5N dans chaque puits.

IV. EMPLOI DES CONFETTI :

L'un des intérêts de l'ELISA est sa faible consommation en sérum. Dans le but de pouvoir appliquer cette technique à un dépistage de masse, nous avons essayé de réaliser des dilutions sériques à partir d'éluats de sang séché sur confetti. Les avantages de la méthode sont multiples :

Les prélèvements sériques se trouvent simplifiés : ils se résument à une simple piqûre au bout du doigt, suivie de l'imprégnation sur les deux faces d'un papier filtre, avec la goutte de sang obtenue.

La conservation des échantillons est excellente à la température ambiante et à l'abri de l'humidité. D'autre part la piqûre d'un doigt est mieux acceptée par les populations que la prise de sang par ponction veineuse. Enfin les confettis sont d'une manipulation plus aisée que les tubes capillaires héparinés.

Le seul problème que pose leur emploi est la reproductibilité des résultats et la bonne corrélation confetti-sérum aux dilutions utilisées. Nous avons envisagé ces deux aspects du problème en étudiant successivement la quantité de sérum absorbée par confetti le temps d'éluotion maximale la reproductibilité des résultats d'un confetti à l'autre, et enfin la corrélation confetti-sérum.

1. Quantité de sérum absorbé par confetti.

Nous avons choisi une simple perforreuse de bureau donnant des confettis réguliers de 6 mm de diamètre. Une méthode de pesée portant sur 50 confetti nous a permis d'évaluer la quantité de sérum absorbé sur chaque confetti : 4,5 microlitres. En fait ce chiffre est certainement surévalué, car l'imprégnation sanguine est moins parfaite dans les conditions d'emploi sur le terrain. Si bien que nous avons retenu le chiffre de 4 microlitre comme la quantité moyenne absorbée par confetti. La dilution à employer étant de 1/125 ème il suffit d'éluer chaque confetti dans 0,5 ml de tampon.

2. Temps d'éluotion maximale.

Nous avons tenu l'éluotion pour maximale quand le confetti était entièrement décoloré et la réaction reproductible. Nous proposons l'éluotion suivante : 1 nuit à 4°.

3. Reproductibilité des résultats :

Le but de la manipulation était de démontrer l'homogénéité de l'absorbtion sanguine par le papier filtre. Nous avons réalisé 3 confetti successifs chez des sujets bilharziens confirmés et chez des sujets sains. Ces 3 confetti ont été testés le même jour sur une plaque afin d'éliminer toute autre variation (Adsorption antigénique, manipulation, différence entre lots d'Ag ou de tampon, différence de manipulateur etc...). Les résultats sont donnés dans le tableau I.

La comparaison des moyennes des 3 séries de confetti a été faite par l'intermédiaire d'une analyse de la variance qui ne montre pas de différence significative entre les 3 séries de mesures :

$$F_{42}^2 = 0,02 \quad \text{N.S.} \quad (F_{42}^2 \text{ 5 \%} = 3,23)$$

4. Etude de la corrélation confetti-plama

Nous avons réalisé cette étude en comparant sur la même plaque, des prélèvements sanguins faits le même jour à la fois sur tube capillaire hépariné et sur confetti, chez des malades schistosomiens et des sujets sains. La dilution utilisée était dans les deux cas de 1/125. Les phamas et confetti ont été traités à distance du prélèvement dans les mêmes conditions qu'une enquête épidémiologique sur le terrain avec traitement des échantillons lors du retour au laboratoire central.

Les résultats sont donnés dans le tableau II.

La comparaison des 2 séries de mesures a été faite au moyen d'un test t de Student Fisher, (séries appariées) qui ne montre pas de différence significative entre les 2 séries.

$$t_{34 \text{ ddl}} = 0,3 \quad \text{N.S.} \quad (t_{34 \text{ ddl}, 5 \%} = 2)$$

CONCLUSION :

Nous avons finalement retenu le mode opératoire suivant :

2. Mode opératoire

2.1. Fixation de l'Antigène :

Nous utilisons un Ag total de schistosome adulte. Nous réalisons une solution mère de 3 mg/ml en tampon carbonate, fractionnée en tubes de 100 microlitres et conservée au congélateur.

Les dilutions d'Ag sont réalisées à partir de cette solution mère : 20 micro-litres de solution mère suffisent pour une plaque. Avec 2 mg nous pouvons sensibiliser 25 plaques, ce qui permet de tester environ 2450 sérums. On dépose 200 micro-litres de la dilution antigénique en tampon carbonate (5 micro g/ml) dans chaque puits.

Il faut 1 puits pour le blanc des réactifs
1 puits pour le témoin négatif
1 puits pour le témoin positif
1 puits par sérum à tester.

Nous recouvrons la plaque d'un couvercle et la disposons dans une boîte de Pétri avec un peu d'eau au fond, afin d'éviter toute évaporation de la solution antigénique. Nous laissons la plaque une nuit à 37°. Les plaques peuvent être ensuite stockées au frigidaire au moins 10 j.

2.2. Lavages :

L'excès d'Ag non adsorbé est éliminé par 3 lavages successifs en tampon PBS tween (le tween servant ici d'agent mouillant). Nous distribuons dans chaque puits 250 micro-litres de tampon à l'aide d'une seringue de Cornwall et laissons en contact une à deux minutes entre chaque lavage. Il suffit ensuite de vider la plaque par retournement brusque.

2.3. Incubation des sérums :

Nous préparons les dilutions sériques en plongeant chaque confetti dans des tubes à essais numérotés contenant 0,5 ml de tampon PBS tween. L'éluion s'accomplit au cours d'une nuit. Nous répartissons ensuite 200 micro-litres de sérum dans chaque puits. Dans le puits du blanc des réactifs, nous mettons du tampon à la place du sérum.

Nous laissons incuber 3h à la température du laboratoire.

2.4. Lavages :

Nous lavons chaque plaque comme précédemment.

2.5. Incubation du conjugué :

Nous préparons la dilution du conjugué au 1/2000^{ème}, donc 10 micro-litres dans 20 ml de tampon PBS tween pour une plaque. Avec 1 ml de conjugué nous pouvons ainsi réaliser 100 plaques et tester environ 9 300 sérums. Nous répartissons 200 micro-litres de conjugué par puits et laissons incuber 3h à la température du laboratoire.

2.6. Lavages :

Nous procédons comme précédemment.

2.7. Révélation :

Nous déposons dans chaque puits 200 micro-litres de révélateur préparé extemporannément, nous laissons en contact 1h exactement puis stoppons la réaction enzymatique avec de l'HCL 5N : 25 micro-litres par puits.

2.8. Lecture :

La lecture se fait au spectrophotomètre. Nous réglons l'appareil sur 405 nm, faisons le zéro optique avec le blanc des réactifs et lisons chaque sérum automatiquement.

Les résultats sont exprimés en densité optique (DO).

/ A N N E X E I /

1. Matériel utilisé :

1.1. Les réactifs :

Tampon carbonate Ph 9,6

- Carbonate de Na (sel cristallisé 10 H ₂ O)	1,59 g
Bicarbonate de Na (0,035 M)	2,93 g
Azid de Na	0,2 g
- Eau distillée	1000 ml

(conservation 15j à 4°)

Tampon PBS tween

Chlorure de Na	40 g
Phosphate disodique cristallisé 12 H ₂ O	5,35 g
Phosphate monosodique cristallisé 2 H ₂ O	1,53 g
Tween 20	2,5 ml
Eau distillée	5000 ml

(conservation 1 semaine à la température ambiante)

Conjugué

Conjugué anti-immunoglobuline humaine de mouton, marqué à la peroxydase (Institut Pasteur).

Réactif de coloration :

Tampon phosphate Ph 6 :

(Phosphate monopotassique	13,6 g
Eau distillée)	100 ml

Cette solution est à un pH de 4,4. On l'amène à un pH 6 en ajoutant environ 36,5 ml de la solution suivante :

Phosphate bipotassique	8,7 g
Eau distillée	50 ml

(conservation 15 j à 4°)

Au moment de l'emploi, mélanger :

0,3 ml de tampon phosphate pH 6	
0,3 ml d'eau oxygénée à 1 volume préparée extemporannément	
30 ml d'eau distillée	
0,25 ml d'une solution d'Orthodianisidine :	
Orthodianisidine (sigma)	5 mg
Méthanal	0,5 ml

(le révélateur ne se conserve pas).

1.2. Le matériel :

- plaques de microtitration COOK MICROTITER U M 24 A
- seringue Hamilton de 20 micro litres
- pipette type Eppendorf de 200 micro litres
- spectrophotometre
- seringue de Cornwall 1 ml

Tableau I : Reproductibilité des confetti

N° sérums	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
1e serie	64	80	107	79	50	94	101	71	92	78	70	73	73	72	91
2e serie	52	75	107	70	52	107	105	74	78	101	64	85	70	75	85
3e serie	49	88	107	68	45	107	89	77	78	89	85	73	72	72	85

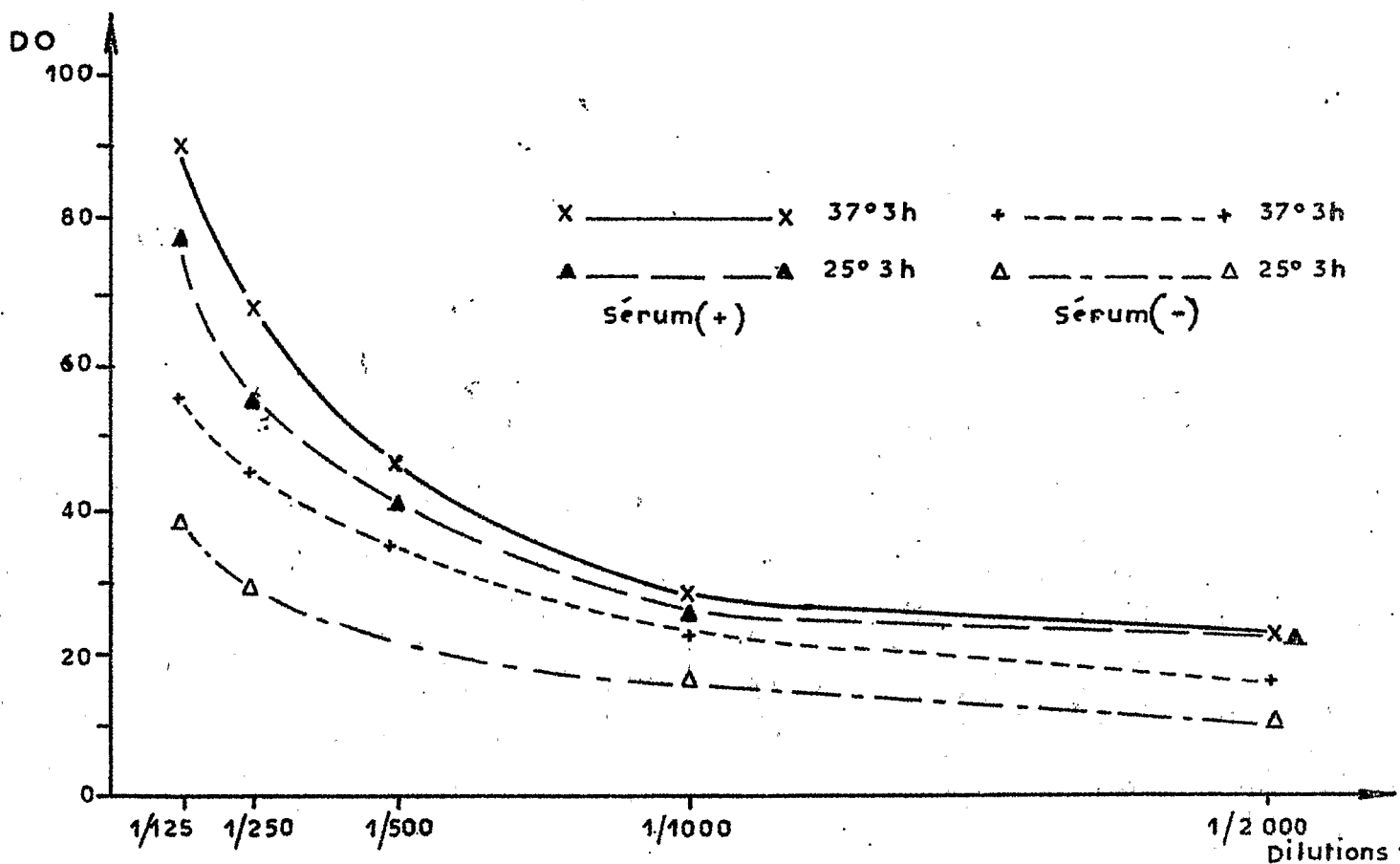
Tableau II : Corrélation serum/confetti

N° serum	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
sérum	88	98	73	60	42	27	17	33	53	81	67	34	23	57	68	24	10
confetti	85	84	88	69	44	24	12	36	50	102	69	40	32	69	42	34	13

N° sérums	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	28	30	31	32	33	34
serum	51	83	33	40	24	66	26	58	37	31	42	22	31	35	31	20	28
confetti	44	80	41	43	4	64	23	58	32	33	32	26	34	29	36	30	30

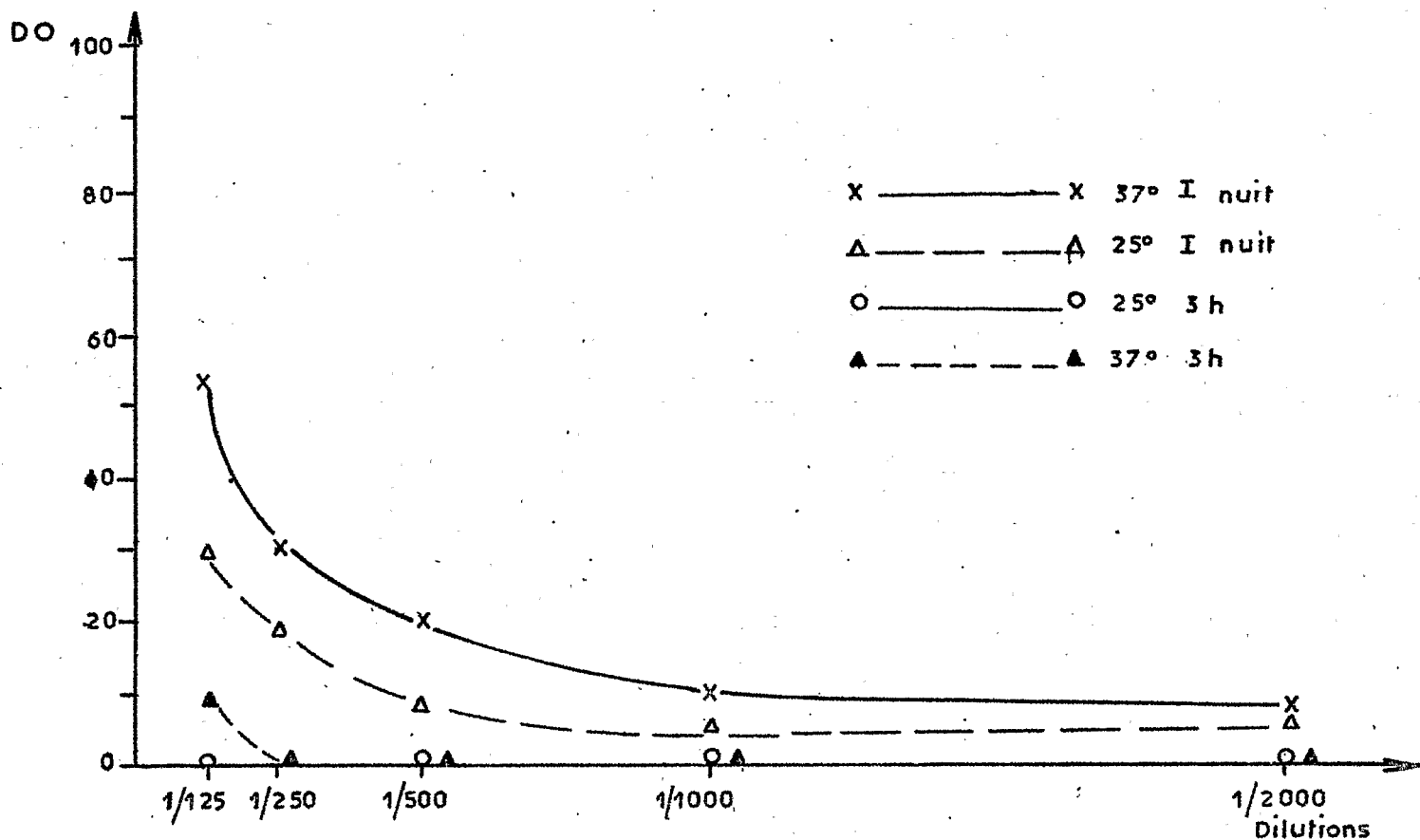
N° sérums	35	36
serum	95	107
confetti	80	104

Courbe A - Adsorption de l'Ag avec glutaraldéhyde.



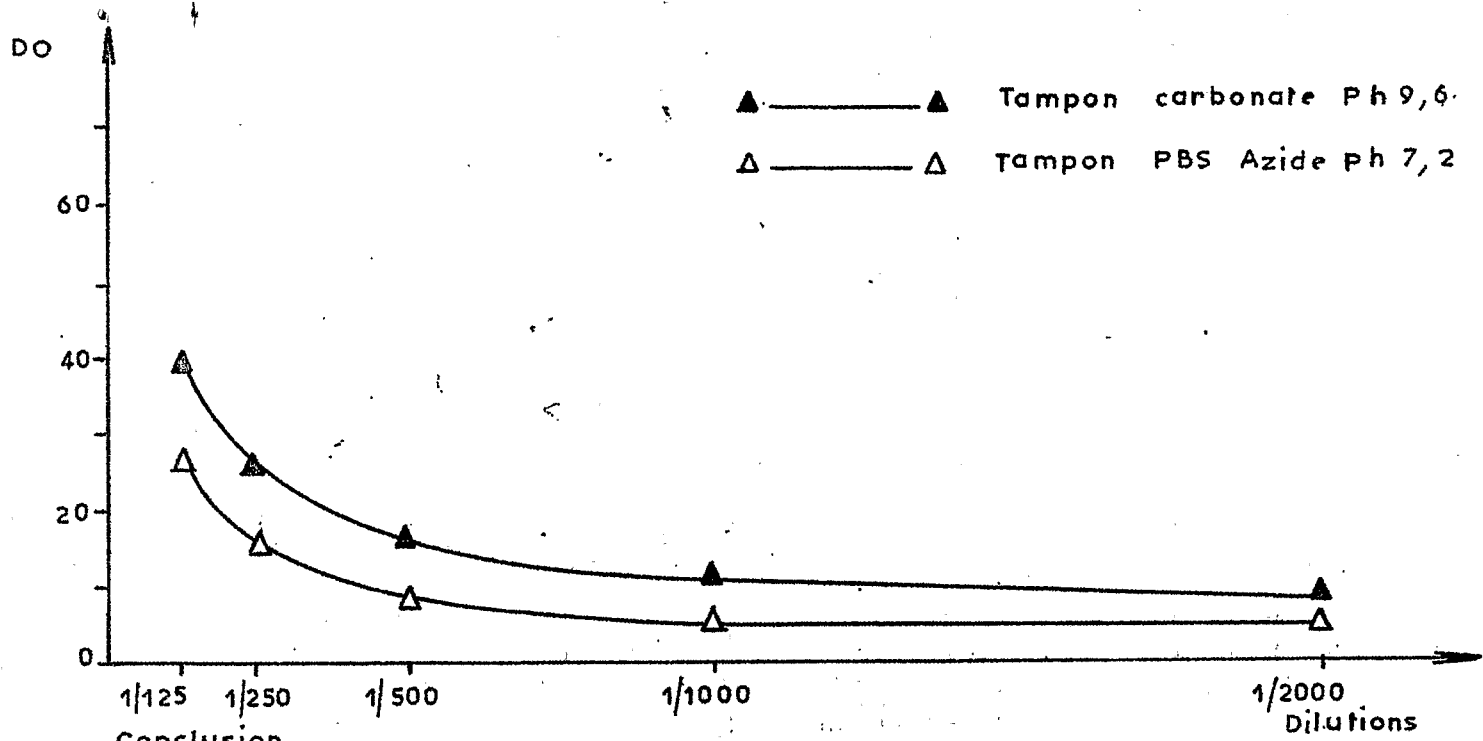
Conclusion - La glutaraldéhyde entraîne une fixation non spécifique des Ac et de Ig marquée.

Courbe B - Variation de la température et du temps sur l'adsorption de l'Ag.



Courbe C - Adsorption de l'Ag dans différents tampons

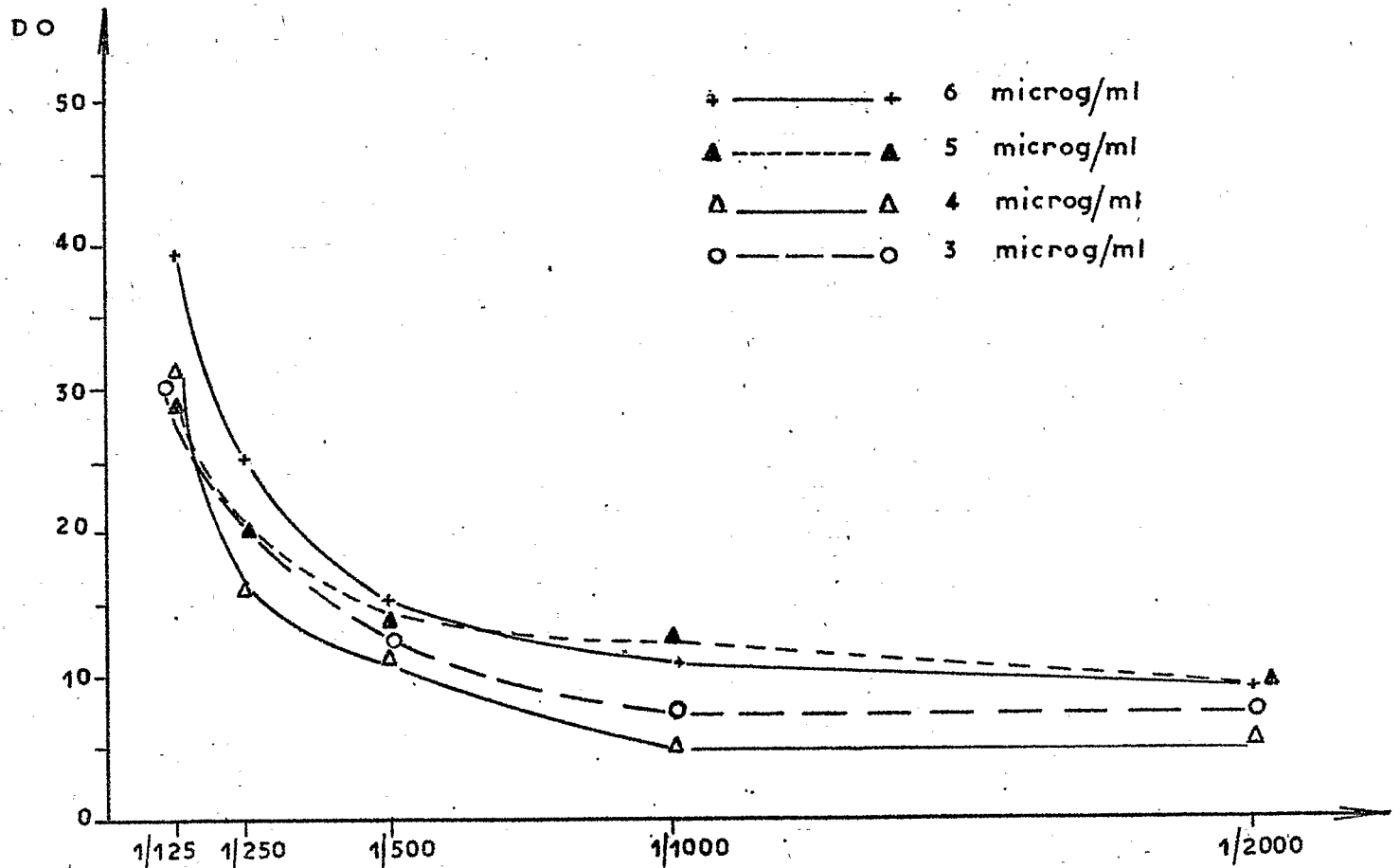
13



Conclusion -

C'est en tampon carbonate que la cootation est la meilleure.

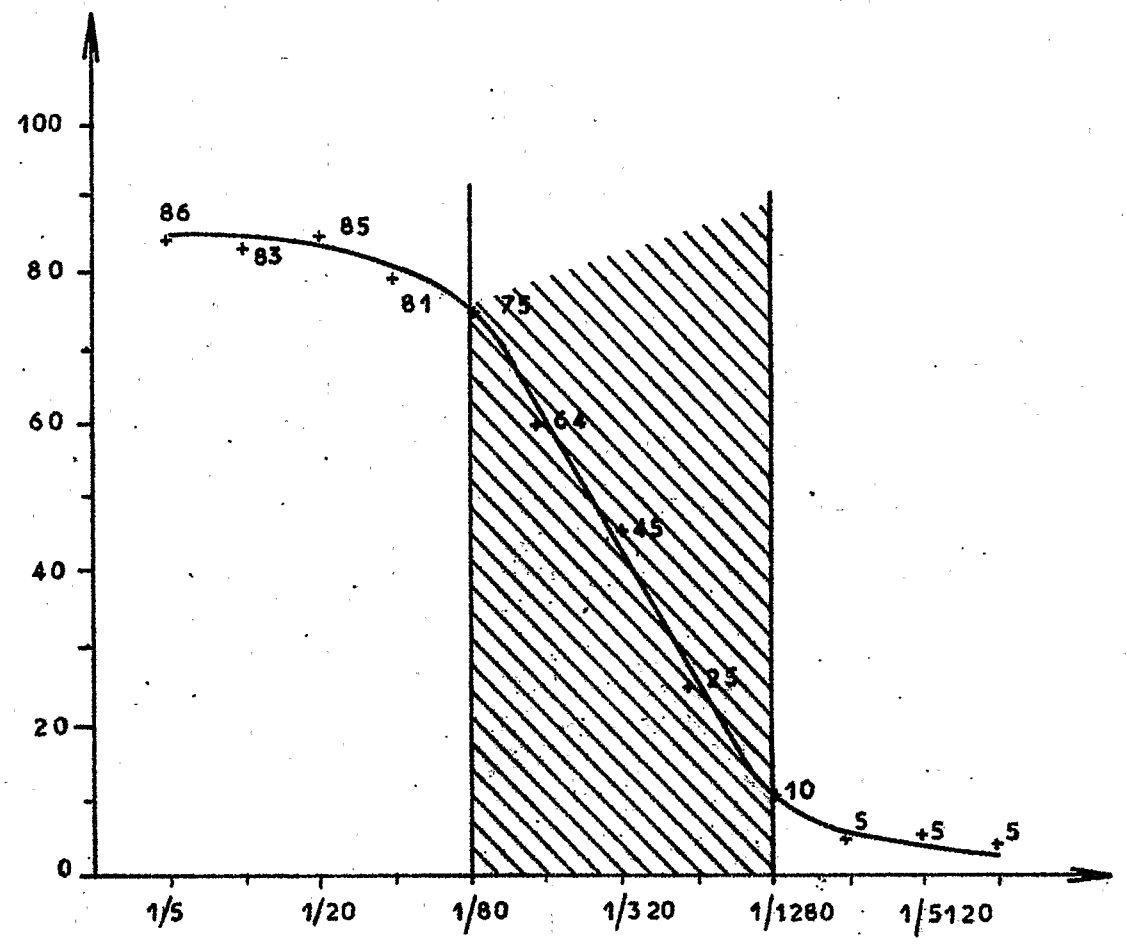
Courbe D - Dilutions optimales Ag/Ac



Conclusion -

La meilleure dilution antigénique à utiliser c'est 5 microg/ml.

Courbe D 1 = Courbe des dilutions s eries

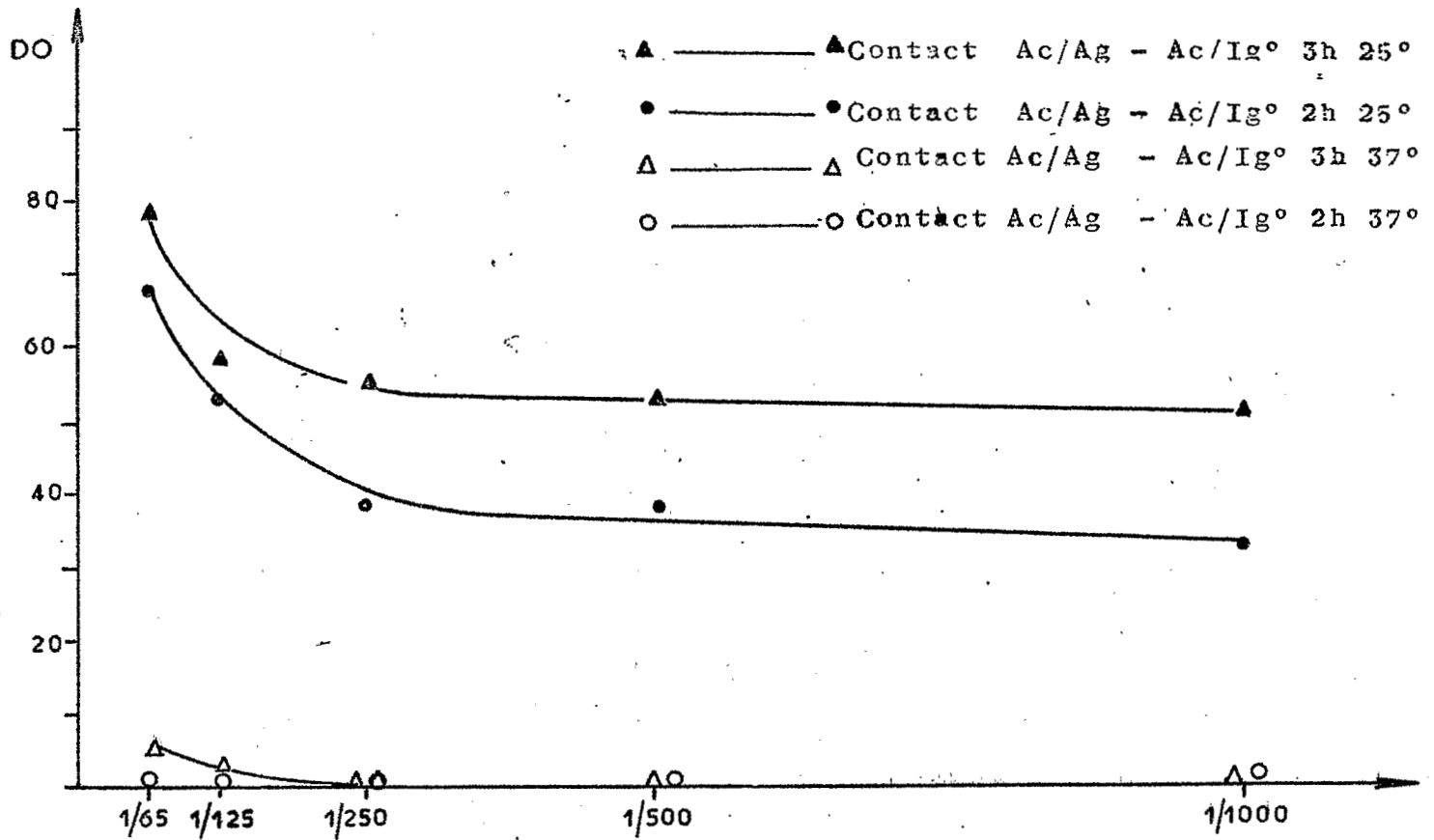


Conclusion - C'est pour des dilutions de 1/80   1/1280 que la variation des DO est la plus importante.

104

Courbe E - Etude des différents temps de contact Ag/Ac - Ac/Ig°

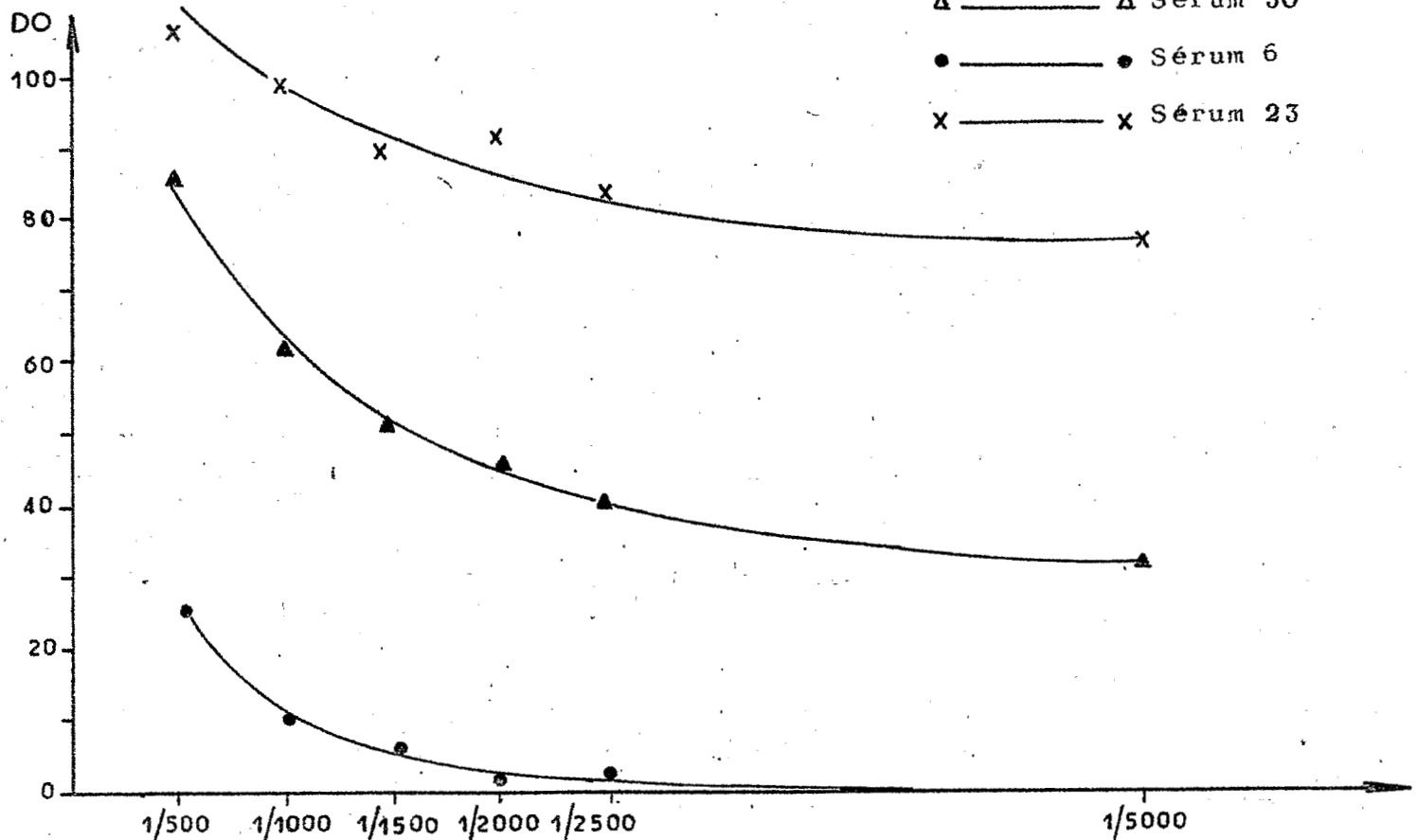
14



Conclusion -

Bons résultats avec un temps de contact de 3h à 25°, résultats nuls à 37°.

Courbe F - Dilution optimale du conjugué.



Conclusion -

La meilleure dilution du conjugué 1/2000