

Immunologie

Kits

**Réf :
106 427**

Français – p 1

Kit test de Mancini de simulation

Version : 1203

1. Description

Le but du test d'immunodiffusion de Mancini sur gel d'agar est la mise en évidence de la liaison antigène-anticorps et de sa spécificité.

Pour cela, le test réel utilise du sérum d'un petit Mammifère (un lapin par exemple) préalablement immunisé par injection d'un antigène connu (en général de l'albumine sérique de bœuf BSA) et diverses solutions d'antigènes dont celui injecté.

La présence dans le sérum d'anticorps dirigés contre l'antigène injecté préalablement et leur spécificité sont caractérisés par la méthode d'immunodiffusion radiale simple appelé aussi technique de Mancini.

Le principe du test repose sur une diffusion simple, c'est-à-dire qu'un seul réactif diffuse, celui qui sera déposé dans les puits, l'autre est déjà présent dans la gélose. Le réactif diffusant migre dans une gélose jusqu'à l'établissement d'un gradient de concentration.

La spécificité antigène-anticorps, qui correspond à la reconnaissance et fixation des anticorps sur les antigènes va engendrer la formation de complexes immuns (complexes antigènes-anticorps). A la zone d'équivalence entre Ag et Ac, ces complexes vont former des halos concentriques de diamètre proportionnel à la concentration de la solution antigénique/ sérum déposée.

En réalisant une gamme étalon de dilution, ce test va permettre de déterminer la concentration en antigène ou anticorps d'un échantillon.

Cette version de simulation reproduit le principe de la technique de Mancini.

Les résultats observés sont similaires à ceux du test réel. La rencontre dans le gel entre la solution de NaOH (simulant la diffusion de l'antigène spécifique) et la solution de sulfate de zinc (simulant les anticorps contenus dans la gélose) se traduit par la formation d'un précipité de couleur blanche simulant la formation des complexes immuns.

Avantages de la version de simulation :

L'utilisation de produits de substitution présente divers avantages :

- La diffusion de ces produits dans le gel étant plus rapide, les résultats apparaissent au bout de 40 minutes environ au lieu des 24 heures nécessaires pour le test réel. Ceci peut permettre la réalisation du test et l'interprétation des résultats au cours d'une même séance.
- Aucun produit d'origine animale n'est manipulé par les élèves.
- La conservation se fait à température ambiante.

2. Composition

Ce kit permet de faire manipuler jusqu'à 30 tests, 1 boîte = 1 test.

1 sachet

- 30 boîtes de pétri de 55 mm de diamètre.

1 sachet de réactif

- 1 tube étiqueté **A** (Sulfate de zinc)
- flacon étiqueté **B** contenant 4,5 g d'agar-agar en poudre,
- 4 tubes de « sérum » solution de soude prête à l'emploi
 - 1 tube eppendorf 1,5 ml [14 g/ L] - étiqueté **C**
 - 1 tube eppendorf 1,5 ml [7 g/ L] - étiqueté **D**
 - 1 tube eppendorf 1,5 ml [3.5 g/ L] - étiqueté **E**
 - 1 tube eppendorf 1,5 ml [4.665 g/ L] - étiqueté **F**
- 5 emporte-pièces avec poire d'aspiration, réutilisables.



3. Matériel complémentaire nécessaire

Pour la préparation de la manipulation :

- 1 micro-ondes ou bain-marie,
- 1 bécher de 500 mL,
- 1 agitateur en verre ou une spatule,
- 1 pipette de 5 mL (ou plus) avec pipeteur,
- 1 gant anti-chaueur,
- eau distillée (90 mL).

Pour la manipulation :

- 6 pipettes Pasteur en polyéthylène de 1mL (ou 3 mL) pour le dépôt des gouttes,
- Feutres permanents (1 par binôme),
- 1 portoir pour microtubes.

4. Application expérimentale – Mode opératoire

4.1 Préparation de la manipulation

Prévoir 1h30 pour cette étape qui peut être réalisée quelques jours à l'avance.

4.1.1 Préparation du gélose contenant les anticorps (simulés)

- Dans un bécher (100mL) dissoudre le contenu du tube A (Antigène) dans 50 mL d'eau distillée, dissoudre un maximum
- Préparation du gel d'agar-agar :
 - Transvaser dans un bécher de 500 mL le contenu du tube B (agar-agar).
 - Ajouter 200 mL d'eau distillée tout en remuant pour dissoudre l'agar.
 - Chauffer le mélange soit au micro-ondes soit dans un bain-marie proche de l'ébullition.

Au micro-ondes chauffer progressivement en interrompant régulièrement pour remuer la préparation. Arrêter de chauffer quand le mélange devient parfaitement limpide, c'est-à-dire au tout début de l'ébullition.

Au bain-marie chauffer le mélange en remuant jusqu'à ce qu'il devienne parfaitement limpide et arrêter au tout début de l'ébullition (20 minutes environ).

- Retirer le bécher avec précaution (utiliser un gant anti-chaueur).

- Incorporer de suite la solution d'anticorps 50 ml (ZNSO4), bien mélanger à l'aide d'un agitateur en verre, pour dissoudre parfaitement les résidus solides. Procéder ensuite rapidement au coulage des boîtes

4.1.2 Coulage des boîtes avec le gel chaud

- Pipeter avec la pipette de 5 à 6 mL le gel d'agar chaud et fluide et couler 4 mL (pas moins) dans chacune des boîtes.
- Aussitôt agiter légèrement la boîte pour égaliser le niveau et supprimer les bulles éventuelles. Mettre le couvercle sur la boîte.
- Laisser refroidir les boîtes sur une surface plane sans y toucher pendant les 5 premières minutes nécessaire à la prise du gel d'agar. Le refroidissement complet prend environ 30 minutes.

Attention : Le gel commence à se solidifier assez rapidement, il ne faut donc pas trop attendre pour couler les boîtes. Si le gel n'est plus assez fluide, il suffit de le refaire chauffer jusqu'à ce qu'il soit à nouveau parfaitement translucide.

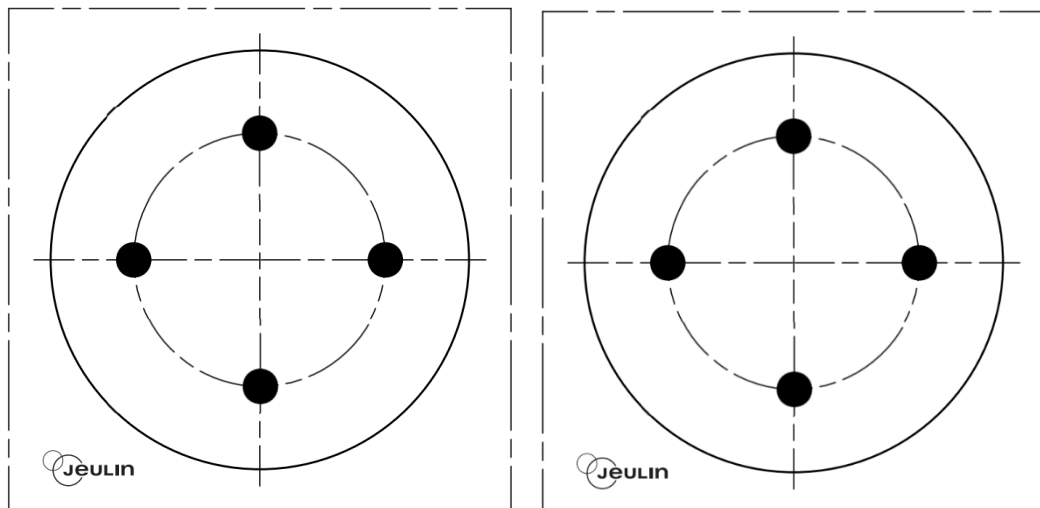
Remarque : Les boîtes obtenues sont utilisables dès la solidification du gel et peuvent être conservées 4 à 5 jours au réfrigérateur (4°C) dans une enceinte humide pour éviter la déshydratation du gel.

4.1.3 Préparation des réactifs

- Aucune préparation n'est à prévoir, les tubes (solution antigénique) C, D E et F qui sont prêts à l'emploi. Le tube F peut cependant être ré-étiqueté « solution à tester ».
- Marquer au feutre les 4 pipettes Pasteur d'une lettre de C à F afin que chaque tube ait sa pipette dédiée.

4.2 Manipulation

Pour chaque test, il faut 1 boîte, d'une mire pour le repérage des puits, d'un emporte-pièce et d'un feutre permanent



4.2.1 Réalisation des puits dans le gel

- Poser la boîte (couvercle vers le haut) sur la mire qui sert de modèle et l'ouvrir.
- Tout en pinçant fermement la poire de l'emporte-pièce percer la gélose jusqu'au fond de la boîte au niveau d'un repère de la mire puis relâcher la poire et retirer l'emporte-pièce. Le disque de gel formé reste dans l'emporte-pièce et un puits apparaît dans la boîte.
- En suivant la même méthode, réaliser les 3 autres puits.

Remarque : Si le disque de gel ne s'enlève pas lorsque l'emporte-pièce est retiré, il peut être facilement éliminé à l'aide d'un cure-dent ou d'une épingle.

Attention : il est important de ne pas fendre le gel lors de la réalisation des puits et de respecter le modèle pour leur disposition. Une augmentation de la distance entre le puits central et les puits périphériques nuit à la lisibilité des résultats.

4.2.2 Dépôts des solutions antigéniques

- Avant tout dépôt, marquer au feutre sous la boîte et au niveau de chaque puits la lettre correspondant au réactif déposé afin de se souvenir de la disposition des produits.

Attention : Il est important que les puits soient **entièrement** remplis sans aucune bulle. Si la solution déborde sur le gel, on doit pomper immédiatement l'excédent à l'aide d'un petit morceau de papier absorbant et éventuellement compléter le puits.

Gamme étalon, pour les besoins du contexte pédagogique, on exprimera les concentrations simulées en mg/l

Tube C : 14,0 mg/l

Tube D : 7,0 mg/l

Tube E : 3,5 mg/l

Tube F : 4,7 mg/l (Solution inconnue x)

4.2.3 Obtention des résultats

Laisser reposer les boîtes à plat avec leur couvercle pendant 40 minutes environ. Les puits vont progressivement s'assécher, signe que la diffusion a lieu, et les résultats vont apparaître. Les résultats resteront visibles quelques jours si on évite le dessèchement du gel en stockant les boîtes dans une enceinte humide au frais.

Lecture et interprétation des résultats

Le diamètre externe au carré du cercle de précipitation est proportionnel à la concentration de l'antigène.

Lecture :

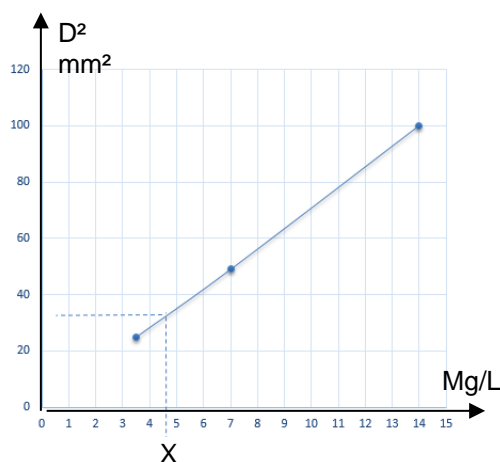
Mesurer les diamètres des cercles qui sont apparus autour de puits C, D E.

Tracer la courbe D² en fonction

Tracer la droite d'étalonnage D² en fonction de la concentration mg/L

Interprétation :

A partir de la mesure du diamètre (D²) du cercle F, il devient possible de déterminer la concentration en antigène de l'échantillon X analysé.



Conservation, tri et récupération

Le kit se conserve à température ambiante à l'abri de la lumière solaire directe.

Les gels contenus dans les boîtes peuvent être jetés à la poubelle, après une éventuelle décontamination à l'eau de javel, si des colonies de bactéries ou de moisissures sont apparues.

Les emporte-pièces et les boîtes sont réutilisables après lavage.

5. Pistes de contextualisation

- Vérification concentration BSA
- Dosage de l'albumine d'un sérum
- Déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X (DICS-X)
- Méningite tuberculeuse
- ...

6. Service après-vente

Pour toute information complémentaire
contacter le **Support Technique** au **0 825 563 563*** *

0,15 € TTC/min. à partir un téléphone fixe

JEULIN

468 rue Jacques Monod

CS 21900

27019 EVREUX CEDEX France



Assistance technique en direct

Une équipe d'experts
à votre disposition
du lundi au vendredi
de 8h30 à 17h30

- Vous recherchez une information technique ?
- Vous souhaitez un conseil d'utilisation ?
- Vous avez besoin d'un diagnostic urgent ?

Nous prenons en charge
immédiatement votre appel
pour vous apporter une réponse
adaptée à votre domaine
d'expérimentation :
Sciences de la Vie et de la Terre,
Physique, Chimie, Technologie.

Service gratuit*

0 825 563 563 choix n°3**

* Hors coût d'appel. 0,15 € TTC/min à partir d'un poste fixe.

** Numéro valable uniquement pour la France métropolitaine et la Corse. Pour les DOM-TOM et les EFE, composez le +33 2 32 29 40 50.

Aide en ligne
FAQ.jeulin.fr



Direct connection for technical support

A team of experts
at your disposal
from Monday to Friday
(opening hours)

- You're looking for technical information ?
- You wish advice for use ?
- You need an urgent diagnosis ?

We take in charge your request
immediatly to provide you
with the right answers regarding
your activity field : Biology, Physics,
Chemistry, Technology.

Free service*

+33 2 32 29 40 50**

* Call cost not included.

** Only for call from foreign countries.



468, rue Jacques-Monod, CS 21900, 27019 Evreux cedex, France

Métropole • Tél : 02 32 29 40 00 - Fax : 02 32 29 43 99 - www.jeulin.fr - support@jeulin.fr

International • Tél : +33 2 32 29 40 23 - Fax : +33 2 32 29 43 24 - www.jeulin.com - export@jeulin.fr

SAS au capital de 1 000 000 € - TVA intracommunautaire FR47 344 652 490 - Siren 344 652 490 RCS Evreux