

4.2 La méthode la plus utilisée pour le diagnostic viral

Bienvenue. Il y a des techniques sérologiques dans laquelle la quantité d'anticorps peut être quantifiée plus rapidement que dans l'épreuve de neutralisation virale que nous avons vu dans la vidéo précédente, bien que nous ne pouvons pas évaluer la protection qu'ils ont. Ces techniques ont en commun que l'un des deux réactifs, l'antigène ou, plus fréquemment, l'anticorps, sont marqués par une molécule, qui peut être fluorescents, un isotope radioactif, un métal lourd, ou une enzyme. Selon le marqueur ils sont appelés d'une manière ou d'une autre, bien que le principe est toujours le même. Dans cette vidéo, nous allons voir les tests qui utilisent des enzymes comme marqueurs, en particulier, un appelé ELISA, et ne pense pas que c'est parce que une personne portant ce nom inventé.

Dans tous les tests qui utilisent des marqueurs, tout d'abord nous devons absorber ou lier des anticorps ou des antigènes sur une surface qui est le détenteur, appelé en phase solide, et le processus d'adsorption ou de fixation est appelé « revêtement ». Dans le cas de l'ELISA, la phase solide peut être une plaque de polystyrène, en général, qui a 96 puits à fond plat. Après avoir enduit et laver les puits, l'échantillon à tester est ajouté en double exemplaire, c'est-à-dire dans deux puits. L'échantillon peut être antigène viral, si la plaque est recouverte d'anticorps, ou le sérum si elle est revêtue d'antigène viral. Nous laisser incuber à la température appropriée afin de favoriser l'union antigène-anticorps, habituellement à 37°C. On se lave soigneusement mais complètement, pour éliminer les réactifs qui ne sont pas conservés à la phase solide. Nous continuons à ajouter des réactifs, incubation et de lavage autant de fois comme l'exige le protocole de chaque type particulier d'ELISA. L'avant-dernier réactif est généralement le « conjuguer », quels sont les anticorps liés à une enzyme. Cela signifie, qu'ils sont « étiquetés ». Après un autre d'incubation et de lavage, nous ajoutons le substrat de l'enzyme.

Les enzymes plus couramment utilisés sont la peroxydase, phosphatase alcaline et la luciférase. Dans tous les cas elles produiront une réaction colorée ou incolore, dont l'intensité dépend de la quantité de l'enzyme présente dans le puits. Nous quantifier cette intensité avec l'instrument correspondant.

Comme toujours, il ne faut pas oublier d'inclure des contrôles positifs et négatifs. Nous allons voir quelques types d'ELISA.

ELISA indirect

Dans le test ELISA indirect nous enrober le puits avec des antigènes, nous ajoutons le sérum à tester, c'est-à-dire, échantillon, et le conjugué qui dans ce cas sont des anticorps anti-immunoglobulines de la même espèce que l'échantillon, marqué avec l'enzyme. Cet anticorps est appelé anticorps secondaire. Vous savez que vous devez incuber et laver entre chaque étape. S'il y a des anticorps spécifiques, couleur se développera en ajoutant le substrat de l'enzyme.

ELISA concurrentielle

ELISA concurrentielle est une technique ELISA qui peut être adapté pour détecter des anticorps ou des antigènes. Première nous allons voir comment c'est fait pour quantifier les anticorps. La première étape consiste à ajouter le sérum problème pour une quantité constante de virus, qui est l'antigène. Après incubation, le mélange est ajouté au puits recouverts d'anticorps. S'il y avait beaucoup d'anticorps dans l'échantillon il y aura peu virus pour rejoindre les anticorps dans le puits. La dernière étape consiste à ajouter un conjugué anti-Virus, et évidemment, le substrat de l'enzyme. Dans le cas d'un échantillon positif avec un titre élevé, Il y aura peu de couleur signal dans l'échantillon. C'est pourquoi on l'appelle concurrentiel.

Nous pourrions aussi faire ce test de façon différente, nous revêtemons avec l'antigène, plutôt qu'avec des anticorps. Dans ce cas, nous ajouterions simultanément le sérum problème et un

conjugué enzyme-étiqueté d'anti-virus. Les deux types d'anticorps rivalisent pour la liaison du virus, donc, si le titre du sérum test est élevé, il n'y a pas d'espace pour le conjugué et après lavage et l'ajout du substrat ne développera de couleur, ou cela va être très discret car nous pouvons voir dans cette image.

Je suis sûr que vous savez maintenant comment faire les modifications appropriées pour détecter l'antigène viral au lieu d'anticorps sériques.

ELISA sandwich

Le dernier type d'ELISA qui nous parlerons est « sandwich » ELISA. Les puits sont recouverts d'anticorps et l'échantillon est le virus de problème. Si elle correspond avec les anticorps elle reste attachée au puits. Il est détecté par un conjugué anti-virus : avoir plus de la couleur dans les puits dans lequel le virus plus là est.

Avant que nous terminions cette vidéo, il est pratique pour vous de savoir qu'il y a des systèmes qui permettent de différencier les animaux vaccinés des animaux infectés, qui est très important en médecine vétérinaire. Pour ce faire, le vaccin doit être conçu de manière qu'il ne contient pas tous les antigènes virus, même si, bien sûr, elle doit contenir ceux qui stimulent une réponse neutralisante que nous avons vue dans la vidéo précédente. Ces systèmes sont appelés DIVA, et nous utilisons deux types différents d'ELISA. Arrêter la vidéo pour voir leur raison d'être.

Je vous remercie pour votre attention !