

**MT13794**

**Diagnostic clinique  
d'une Infection HIV**

**E.L.I.S.A.**

*(Enzyme Linked Immunosorbent Assay)*

**Tout les composant de ce kit sont destinés exclusivement à des utilisations à buts pédagogiques. Ils ne peuvent en aucun cas être utilisés à des fins de diagnostiques ou être administrés ou consommés par des êtres vivants.**

**Objectif de l'expérience:**

L'objectif de cette expérience est de comprendre la biologie moléculaire du virus d'immunodéficience humaine et la pathogénicité du Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise.

Les concepts et la méthodologie expérimentaux impliqués dans le test ELISA seront introduits dans le contexte du screening clinique des échantillons de sérum pour des anticorps du virus d'HIV.

**Stockage: Stockez la totalité des composants dans le réfrigérateur.**

Ce kit est conçu pour faire travailler 10 groupes en même temps.

**Contenu**

- A Antigènes HIV (simulé)
- B Control Positif (Anticorps primaire)
- C Doneur 1 Sérum (simulé)
- D Doneur 2 Sérum (simulé)
- E Anti-IgG-peroxidase conjugate (Anticorps secondaire)
- F Hydrogen peroxide, stabilisé
- G acide Aminosalicylic (peroxide co-substrate)
- H Tampon Phosphate concentré

Plaques de microtitration  
Micropipettes  
Microtubes avec couvercle  
Pipettes de 1ml  
Tubes plastique, 50 ml

**Cette expérience ne contient pas le virus HIV ou ses composants. Aucun des composants n'a été préparé à partir des sources humaines.**

- Eau distillée ou déminéralisée
- Bechers
- Incubateurs à 37°C.
- Gants et lunettes jetables
- L'utilisation de micropipettes est recommandée.

Assurez-vous que la verrerie est propre, sèche et exempte de résidu de savon.

Le SIDA est une maladie caractérisée par la détérioration progressive du système immunitaire d'un individu. L'affaiblissement immunologique permet aux agents infectieux tels que des virus, des bactéries, des mycètes et des parasites d'envahir le corps.

En outre, l'incidence de certains cancers augmente considérablement chez ces patients en raison de leur système immunitaire déficient.

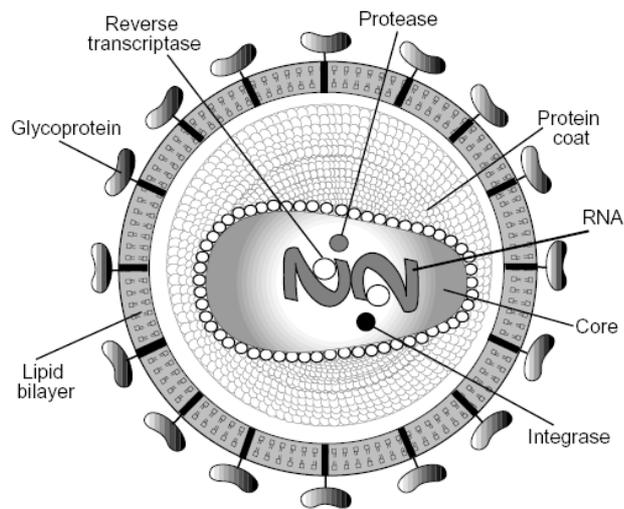
Le SIDA est une menace sérieuse à la santé humaine et est un problème général. La recherche intensive est faite pour découvrir de nouvelles méthodes de détection, de traitement et de prévention.

L'agent étiologique de SIDA (Hiv-1) est le type 1 du virus de l'immunodéficience humaine, qui est un retrovirus. Retrovirus contiennent un génome d'Arn et la transcriptase reverse correspondante.

Des membres de la famille de retrovirus sont impliqués dans certains types des leucémies et d'autres sarcomes chez l'homme et des animaux.

La structure et les mécanismes de réplication du HIV est très semblable à ceux des autres retrovirus. HIV est unique dans certaines de ses propriétés : il est spécifiquement dirigé vers les cellules.

La particule virale du HIV est entourée par une bicouche de lipides dérivé de la membrane de cellule hôte pendant le bourgeonnement. Les protéines virales sont identifiées par le préfixe gp (glycoprotéine) ou p (protéine) suivi d'un nombre indiquant le poids moléculaire approximatif en kilodaltons. La bicouche lipidique contient le gp 160, le gp 120 et le gp 41. Le gp 41 ancre le gp 120 dans la bicouche. Sous la bicouche existe une capsid se composant de p17 et p18. dans cette coquille est le noyau viral. Les parois du noyau se compose de p24 et p25. dans le noyau sont deux molécules identiques d'ARN de 9000 nucléotides de longueur. L'hydrogène lié à chaque ARN génomique est une molécule cellulaire de tRNA. Le noyau contient également approximativement 50 molécules de transcriptase reverse. De grandes quantités de virus peuvent être développées dans la culture de tissu pour des buts de diagnostic et de recherches. Plusieurs des protéines virales ont été copiées et exprimées en quantité relativement grande.



## Mécanisme de l'infection par le HIV

Un individu peut être infecté avec le HIV par une abrasion d'une surface muqueuse (par exemple muqueuses vaginales ou rectales), une transfusion sanguine ou par l'injection intraveineuse avec une aiguille souillée. Le virus ou les cellules virale infectées sont présentes dans les fluides corporels tels que le sperme et le sang. Pendant les premiers stades de l'infection chez une personne immunocompétent le virus entraîne des réponses humorales et cellulaires d'immunité qui ont comme conséquence une circulation massive d'IgG dirigées contre les épitopes viraux. Cependant, puisque le virus à un taux élevé de mutation les variantes survivent échappent à l'immunosurveillance. À la différence d'autres polymérase cellulaires d'Adn, la polymérase d'Adn du Hiv (transcriptase reverse) a un taux d'erreur élevé (1 dans 10.000). Ces mutations fréquentes changent continuellement les épitopes viraux de protéine. On pense que ceci est le mécanisme principal de l'immuno-invasion par le HIV.

La cible la plus importante pour le virus sont les cellules hématopoïétique telles que les monocytes de la moëlle, les myélocytes et les lymphocytes dérivés de système immunitaire. L'infection des cellules effectrices du système immunitaire telles que des cellules de T et les macrophages produisent finalement les conséquences cliniques les plus sévères. le gp 120 lie aux récepteurs CD4 sur la surface des cellules T helper (TH). Ces récepteurs sont les glycoprotéines fixés à la membrane et sont impliquées dans la maturation des cellules T à partir des cellules précurseur. Des cellules de TH sont nécessaires aux réponses immunitaires. La bicouche lipidique fusionne avec celle des membranes des cellules et le capsid viral de protéine devient interne suite à un phénomène d'endocytose. Plus tard, le reste des récepteurs CD4 sont pénétrés et le gp 120 apparaît sur la surface de cellules de T.

## Réplication & Transcription du HIV

Par un mécanisme complexe impliquant plusieurs événements, la transcriptase reverse synthétise une copie d'un double brin d'Adn sur le modèle de l'ARN génomique. La molécule de tRNA agit en tant qu'amorce pour la synthèse du premier brin. Le transcriptase reverse, ayant une activité RNase H, dégrade le brin d'Arn du duplex ARN-ADN et

l'activité de polymérase synthétise un brin complémentaire d'Adn. La réverse transcriptase transcrite, migre dans le noyau cellulaire ou elle va être liée de façon covalente à l'ADN cellulaire.

L'Adn intégrée s'appelle ADN proviral ou provirus. Le provirus entre dans une période de latence qui peut durer pendant plusieurs années. L'Adn proviral est repliée avec l'Adn cellulaire et peut être héritée par beaucoup de générations. L'Adn proviral du Hiv contient les gènes principaux communs à tous les retrovirus non-transducteurs. Ces gènes sont gag., pol. et env. HIV contient également cinq ou six autres gènes qui sont beaucoup plus petits. La transcription Retrovirale est un processus complexe produisant une variété de RNAs. Ces Arn transcrits qui restent entiers, sont empaquetés dans des nouvelles particules virales.

Le gène gag. est traduit en polypeptide qui est scindé par une protéase virale dans quatre protéines qui forment les coquilles intérieures. Des inhibiteurs spécifiques de protéase sont employés pour inhiber la protéine et pour contrôler la propagation supplémentaire du virus d'Hiv chez les patients souffrant du SIDA. Le gène pol. code la transcriptase réverse et l'intégrase qui est responsable de l'incorporation génomique de la copie de l'ADN. Le gène env. code pour les glycoprotéines extérieures que les particules virales acquièrent pendant qu'elles bourgeonnent des cellules.

## Réponse Immunologique

Réplique et transcription du Hiv par la réponse immunologique: Les macrophages sont des monocytes circulants et sont impliqués dans l'englobement non spécifique du matériel étranger et les débris cellulaires normaux. Ces matériaux sont dégradés dans les lysosomes des cellules. Les peptides des protéines dégradées étrangères sont transportés à la surface du macrophage où ils restent liés à des récepteurs spécifiques. Les TH, cellules Immunologiquement inactives, interagissent avec les complexes antigène-récepteurs de la membrane et deviennent entièrement fonctionnels.

HIV infecte des macrophages en se liant aux récepteurs du CD4 des cellules. Les cellules entièrement activées de TH sécrètent plusieurs types de facteurs de protéine collectivement connus sous le nom de lymphokines. Plusieurs de ces facteurs sont les interleukins qui stimulent des sécrétions d'anticorps des cellule B, permettent l'activation de macrophage, stimulent la croissance générale de cellules de T et activent les cellules cytotoxiques T. Des cellules cytotoxiques T sont impliquées dans la destruction réelle des cellules étrangères et des cellules de corps infectées avec différents virus. Les cellules inactives TH qui ont été infectées par HIV demeurent dans un état relativement silencieux, semblable à celui des cellules non infectées. Quand une cellule TH contenant le provirus subit l'activation antigénique, l'Adn contenant les copies devient ouverte à la transcription de l'Arn viral.

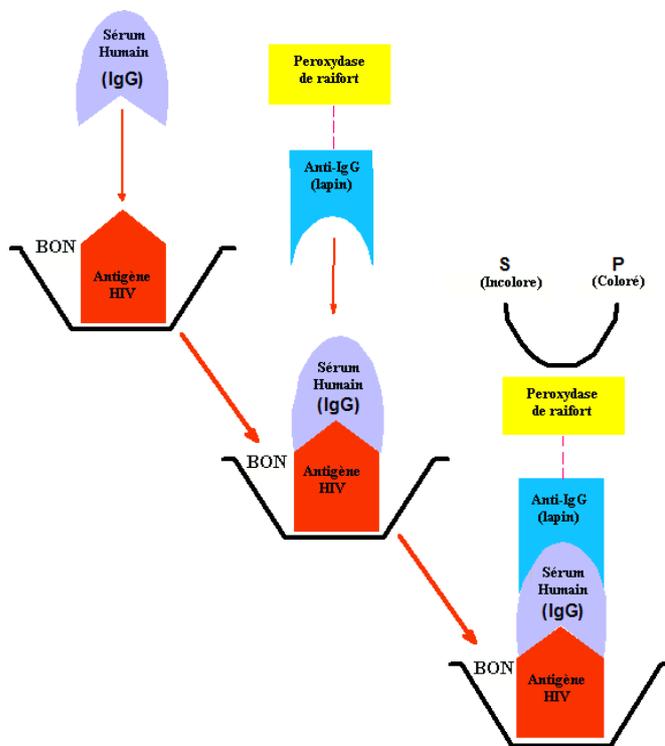
La réplique virale cause la destruction des cellules TH. Les cellules infectées TH forment également des syncytiums, c.-à-d. cellules fusionnées. Les syncytiums se produisent puisque le gp 120 sur la surface infectée de cellules T se lie aux récepteurs CD4 sur d'autres cellules TH. La transmission de cellules à cellules du virus peut se produire dans les syncytiums sans besoin d'intermédiaire viral libre. La réplique du virus procède également dans les macrophages activés qui cause la mort de cellules et la libération des particules virales infectieuses. Ce qui cause l'effondrement complet du système immunitaire.

La longue période de latence après l'infection par le HIV peut être comprise en termes d'activation de cellules TH. Seulement certaines cellules TH sont capables de répondre à un antigène particulier. Les individus infectés mais asymptomatiques d'HIV éprouveront l'exposition habituelle aux produits chimiques, aux virus et aux bactéries. Après les vagues successives des infections la population des cellules de TH et de macrophage deviennent épuisées et le SIDA clinique se développe. Il y a un nombre très petit d'individus qui ont coexisté avec HIV pendant plus de 15 années. Bien que les raisons de cette coexistence avec HIV ne soit pas comprises, le système immunitaire semble demeurer intact. De tels individus tendent à manger bien, pratique des techniques de réduction de stress de pratique. L'analyse génétique peut déterminer si les différences génétiques non subtiles dans le système immunitaire sont des facteurs significatifs.

## Description de la technique

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) a été à l'origine développée pour le dosage d'anticorps. Ces immunoassays ont été également adaptés pour détecter avec succès les échantillons qui contiennent des antigènes.

Cette expérience de simulation Elisa a été conçue pour détecter les IgG circulant d'un patient hypothétique orienté sur l'antigène (HIV) viral. Les tests ELISA sont faits dans des plaques de microtitration. Les plats sont quelque peu transparentes et contiennent beaucoup de petits puits, dans lesquels des échantillons liquides sont déposés. D'abord, les antigènes sont ajoutés aux puits où certains restent adsorbés par association hydrophobe aux parois. Les antigènes peuvent être le lysat entier d'HIV, les protéines spécifiques d'HIV, ou un mélange des deux. Il n'y a aucune spécificité impliquée dans le processus d'adsorption bien que quelques substances puissent montrer peu de liaison au parois. Dans certains cas les antigènes peuvent être liés de manière covalente au plastique en utilisant la lumière UV. Après avoir enlevé le matériel non adsorbé, les emplacements inoccupés sur les parois des puits en plastique sont bloqués avec des protéines, typiquement albumine sérique de gélatine ou de boeuf. Dans cette expérience, si ces anticorps sont présents dans l'échantillon de plasma ils lieront aux antigènes adsorbés dans le puits et resteront là



après lavage. Une solution contenant l'anticorps d'IgG qui lie à n'importe quel genre d'IgG humain, est alors ajoutée aux puits. Si l'anticorps primaire est resté dans la cupule, alors l'anticorps secondaire se liera à lui et restera également fixé après lavage. Ces anticorps secondaires sont habituellement augmentés chez les lapins et les chèvres immunisés avec les fractions humaines d'IgG. Les deuxièmes anticorps d'IgG sont épurés liés de façon covalente à la peroxydase de raifort. Cette modification n'affecte pas de manière significative la spécificité et l'affinité obligatoire de l'anticorps ou l'activité enzymatique de la peroxydase. Après lavage, une solution contenant le peroxyde d'hydrogène et l'aminosalicylate est ajoutée à chacun. La peroxydase possède une activité catalytique élevée et peut excéder des turn over de  $10^6$  par seconde. Beaucoup de Co-substrats donneur d'hydrogène peuvent être employés avec la peroxydase. Ces Co-substrats incluent l'o-diansidine, l'aminopyrine, l'acide aminosalicylic et les nombreux composés phénoliques qui développent la couleur sur l'oxydation. La solution de substrat

supplémentaire est presque sans couleur. La peroxydase convertit le peroxyde en  $H_2O + O_2$  en utilisant le salicylate en tant que donneur d'hydrogène. Le salicylate oxydé est brun et peut être facilement observé dans les puits contenant anti-HIV-1 IgG (plasma positif). Il convient de noter que les préparations d'anticorps polyclonaux à un antigène donné peuvent avoir des affinités obligatoires variables dues aux différences dans les réponses immunologiques entre les animaux. Les différentes immunisations avec le même antigène dans le même animal peuvent également produire des affinités de liaison variables. L'utilisation des anticorps monoclonaux dirigés contre un epitope simple élimine cette variabilité. L'analyse en WESTERN BLOT des échantillons positifs sont employées pour confirmer l'infection par HIV.

## Objectif De l'Expérience

L'objectif de cette expérience est de comprendre la biologie moléculaire du virus humain d'immunodéficience et de la pathogénie du SIDA. Les concepts et la méthodologie expérimentaux impliqués dans le test ELISA seront présentés dans le contexte du criblage clinique des échantillons de sérum pour des anticorps au virus. Des gants et les lunettes de SÛRETÉ de LABORATOIRE devraient être portés par habitude en tant que bonne pratique en matière de laboratoire.

## INSTRUCTIONS GÉNÉRALES ET PROCÉDURES

- Marquer les plaques de microtitration
- Placez les plaques verticalement comme représenté sur la figure 2 (voir notice originale)
- Noter le numéro du groupe et Numérotez les rangées de 1 à 4

Numéroter 5 pipettes comme suit :

- (-) (négatif)
- (+) (positif)
- Ds 1 (Sérum du donneur 1)
- Ds 2 (Sérum du donneur 2)
- PBS (Tampon phosphate)

Utiliser les pipettes spécifiquement pour ce dont elles sont faites conformément aux procédures expérimentales

### Les procédures expérimentales

Préchauffer un four de l'incubation 37°C avant de commencer l'expérience.

### Instructions pour ajouter des liquides et laver des puits

Pour ajouter des réactifs aux puits, employez toujours la même pipette.

**Rincez la pipette complètement** avec de l'eau distillée avant utilisation avant d'introduire le prochain réactif.

### Vidange des puits et lavage:

**Toujours utiliser la bonne pipette.**

A. Utiliser la pipette "PBS", pour ajouter le tampon PBS aux puits dans toutes les rangées.

Ajoutez le PBS jusqu'à ce que chacun soit bien presque plein. La capacité des puits est approximativement de 0,2 ml. Ne laissez pas les liquides se renverser dans les puits adjacents.

B. Avec la pipette, enlevez tout le PBS et le transférer dans le becher marqué "déchets".

## ÉTAPES EXPÉRIMENTALES POUR LE TEST ELISA

1. À chacun des 12 puits, ajoutez 0,1 ml de "hiv" (antigènes viraux);
2. Incubez pendant 5 minutes à la température ambiante;
3. Enlevez tout le liquide (antigènes viraux) à la pipette;
4. Lavez chacun bien une fois avec le PBS comme décrit ci-dessus ("vidange et lavages liquides");  
*Dans des laboratoires de recherches, après cette étape, tous les emplacements de la plaque de microtitration sont saturés avec une solution de blocage se composant d'un mélange de protéine, tel que BSA. Nous avons conçu cette expérience pour éliminer cette étape et gagner du temps;*
5. Ajoutez les réactifs comme décrit ci-après: *Rincer systématiquement les pipettes avant réutilisation, si vous utilisez des micropipettes automatiques, changer d'embout à chaque prélèvement;*
  - Ajoutez 0,1 ml de tampon PBS aux trois puits dans la rangée 1. (c'est le témoin négatif.);
  - Ajoutez 0,1 ml de "+" (positif) aux trois puits dans la rangée 2. (c'est le témoin positif.);
  - Ajoutez 0,1 ml du sérum "DS1" aux 3 puits dans la rangée 3;
  - Ajoutez 0,1 ml du sérum "DS2" aux 3 puits dans la rangée 4;
6. Incubez à 37°C pendant 15 minutes;
7. Enlevez tout le liquide de chacun des puits avec la bonne pipette;
8. Lavez chacun des puits avec le tampon PBS ;
9. Ajoutez 0,1 ml du conjugué peroxydase / anti-IgG (2°Ab) à chacun des 12 puits;

10. Incubez à 37°C pendant 15 minutes. *À ce moment vous pouvez obtenir le substrat à employer dans l'étape 13.*
11. Enlevez tout le liquide de chacun des puits avec la pipette correspondante;
12. Lavez chacun des puits avec le tampon PBS;
13. Ajoutez 0,1 ml du substrat à chacun des 12 puits;
14. Incubez à 37°C pendant 5 minutes;
15. Récupérer la microplaque et observer;
16. Si la couleur n'est pas entièrement développée après 5 minutes, incubez à 37°C pendant une plus longue période.

Rappels:

**AJOUTER DES RÉACTIFS:** Soyez sûr de rincer la pipette avant d'ajouter un nouveau réactif. (étapes 1, 5, 9, et 13). Alternativement, si vous employez les micropipets automatiques, employez un nouvelle embout pour chaque réactif.

**VIDANGE DES PUIITS:** Employez les pipettes spécifiques à chaque produit pour le remplissage (étapes 3, 7, et 11) et pour les lavages (étapes 4, 8 et 12)

Pipette marquée (-) rangée 1

Pipette marquée (+) rangée 2

Pipette marquée DS1 rangée 3

Pipette marquée DS2 rangée 4

Jeter les résidus dans un béccher marqué DÉCHETS

**LAVAGES DES PUIITS:** Pour toutes les rangées, employez la pipette marquée "PBS" jusqu'à ce que chacun soit bien presque plein. (Étapes 4, 8, Et 12).

**REMARQUES** La témoin positif, qui contient les IgG dirigé contre des antigènes HIV, est l'anticorps primaire. Les échantillons positifs de sérum contiennent également des IgG anti-HIV, alors que les échantillons négatifs de sérum ne contiendront pas anti-HIV IgG.

## Guide du professeur

### CONDITIONS EN TEMPS APPROXIMATIVES ET PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

1. La préparation des réactifs prend d'approximativement une et une demi- heure.
2. L'activité expérimentale de l'élève dure approximativement 60 minutes.

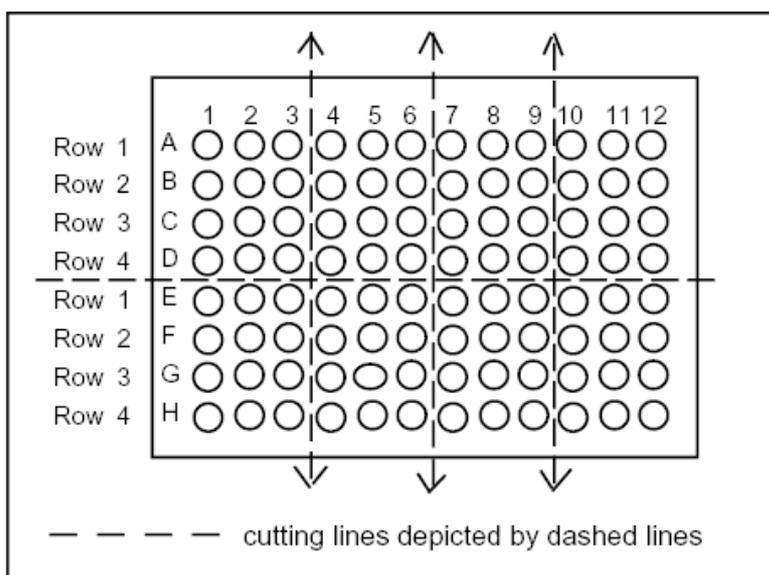


Figure 1

### **PRÉPARATION DES MANIPS:**

- Microplaques : orienter les microplaques comme sur le schéma ci-dessus
- Couper les microplaques selon les pointillés : chaque groupe recevra une plaque de 3 colonnes et 4 lignes.

### **DEPOTS DANS LES RANGEES A à D:**

- Utilisez la pipette correspondante à chaque réactif pour distribuer chacun des produit directement des tubes dans les cupules.
- Marquez les tubes microtest et distribuez les volumes comme précisé ci-après dans "Préparation des réactifs d'expérience "qui apparaît à la page 15.

### **PRÉPARATIONS LE JOUR MEME**

#### **Tampon :**

1. Ajouter tout le concentré salin (H) à 270 ml d'eau distillée. Mélanger.
2. Noter le tampon "PBS".
3. Distribuez 25 ml dans de petits bechers pour chacun des 10 groupes de laboratoire.

#### **Conjugé de peroxydase d'Anti-IgG (anticorps secondaire)**

1. Ajoutez 0,3 ml PBS au conjugué concentré de peroxydase d'Anti-IgG (E). Mélangez en secouant et en retournant le tube.
2. Transférez 15 PBS à un tube en plastique de 50 ml fourni.
3. Transférez le contenu entier du tube E préparé dans l'étape 1 au tube de 50 ml contenant 15 ml de PBS. Label le tube "2°Ab" (anticorps secondaire). Mélanger
4. Distribuez 1,4 ml du conjugué dilué de peroxydase d'Anti-IgG pour chaque groupe.

**PRÉPARATION DU SUBSTRAT de PEROXYDASE  
(15 - 30 minutes avant la dernière incubation)**

1. Mettez 13,5 ml PBS dans le deuxième tube de 50 ml fourni.
2. Ajouter l'acide Aminosalicylic (G) aux 13,5 ml de PBS. Cap et mélanger énergiquement en secouant ou sur un vortex. Il y reste habituellement du matériel non dissous.
3. Ajouter alors 1,5 ml du peroxyde d'hydrogène (F). fermer et mélanger.
4. Distribuez 1,4 ml du substrat de peroxydase pour chaque groupe.

Le substrat est préparé pour la peroxydase, qui est liée au conjugué peroxydase d'anti-IgG (anticorps secondaire). Préparez le substrat 15 - 30 minutes avant que les étudiants en aient besoin pour le développement de la plaque (dernière incubation).

**les composants A à D** peuvent être distribués la veille et stockés au réfrigérateur. Si ces composants sont distribués le jour de la manip, laisser les à température ambiante.

**Distribuer pour chaque groupe :**

A /	HIV ag HIV 1,4 ml
B /	Témoin positif + 0,4 ml
C /	Sérum # 1 DS 1 0,4 ml
D /	Sérum # 2 DS 2 0,4 ml
E + PBS /	Anti-IgG-peroxydase-conjugué 2°Ab 1,4 ml
PBS + F + G /	Peroxydase-enzyme substrat substrat 1,4 ml
H + /	Tampon PBS 25 ml

**Chaque Group doit Recevoir:**

- 1 pièce de la microplaque découpée
- 1 tube marqué "HIV"
- 1 tube marqué "+"
- 1 tube marqué "DS 1"
- 1 tube marqué "DS 2"
- 1 tube marqué "2Ab"
- 1 pipette de 1 ml
- 5 pipettes de transfert
- 1 becher contenant 16 ml de PBS
- 1 becher contenant 100 ml d'eau distillée
- 1 becher vide noté "dechets"
- 1 tube marqué "Substrat" (juste avant la dernière incubation)