

DETERMINATION DES IgG ANTI- β -GLUCANES AVEC LA METHODE ELISA

Leonardi M.S., Liberto M.C., Chisari M.

Institut de Microbiologie Médicale - Fac. Médecine - Messine
Caridi A., Criseo G.

Institut de Microbiologie - Fac. de Science - Messine
Todaro F.

Chaire de Mycologie - Faculté de Médecine - Messine

De nombreuses études ont été conduites par divers auteurs pour tenter de mettre au point des techniques sérologiques qui pourraient être de quelque utilité dans le diagnostic des mycoses profondes. La recherche d'anticorps spécifiques dirigés contre les antigènes de surface (polysaccharide de la paroi) a semblé constituer un espoir certain dans ce domaine, (3). Meckstroth et al. (2), en comparant les techniques de immunodiffusion (ID), agglutination du latex (LA) et ELISA pour la recherche d'anticorps antimannane ont mis en évidence une grande sensibilité de ce dernier test, mais toutefois sont arrivés à la conclusion que la recherche de tels anticorps était de faible utilité quant au diagnostic de la candidose et ce, en accord avec les résultats obtenus par Lehman et Reiss (1) qui ont trouvé des anticorps antimannane également dans la population saine, dont le titre variait de manière important sans raison apparente. L'hypothèse selon laquelle les β -glucanes pourraient avoir un comportement antigénique différent des mannanes nous a conduit à mettre au point un test ELISA pour la recherche des IgG anti β -glucanes.

Matériel et Méthodes:

Antigène: une souche de C. albicans A de 48 h a été cultivée dans le milieu de Winge liquide jusqu'à la phase stationnaire de croissance (4) puis lavée à trois reprises en eau physiologique. L'extraction des β -glucanes a été effectuée selon le protocole décrit par Trevelgan et Harrison (5), Herbert et al. (6), modifié par Cassone et al. (4). Le β -glucanes obtenu ont été comparés à un échantillon standard selon le protocole décrit par Herbert et al. (6). L'échantillon et le standard montraient un'identité révélée par la constance de rapport des valeurs d'absorbance entre 500 et 700 nm.

Sérum: nous avons utilisés des sérums humains positifs, avec un titre d'hémagglutination: (HA) de 1:360 calculé avec le test commercialisé par Roche, provenant de malades atteints de candidose orale. Le contrôle négatif été effectué avec une serum négatif avec une titre de HA 1:4.

Test ELISA: ce test a été exécuté selon la méthodologie de Engvall

et Perlmann (7). Dans le but d'obtenir un système spécifique, sensible et reproductible, ont été évalués tous les paramètres tels que la température et les temps d'incubation, les concentrations de l'antigène et du conjugué dont les variations pouvaient influencer la réussite du système ainsi que nous l'avons déjà vérifié dans d'autres cas. La lecture spectrophotométrique a été exécutée à 400 nm. La densité optique (DO) de 0,3 a été prise comme valeur minimale. Les plaques utilisées ont été celles de polystyrène de la "Virion Ltd" de Zurich ainsi d'ailleurs que l'anti IgG humain conjugué avec la phosphatase alcaline tandis que le substrat représenté par le paranitrophenyl phosphate était de la Sigma Chemical Co.. La concentration optimale d'antigène fixé aux microplaques a été déterminée en sensibilisant les puits des plaques microtiter pendant, une nuit à 4°C avec 200 µl d'antigène dilué dans un tampon carbonate-bicarbonate (pH 9,6) à 0,05 M. Les dilutions de l'antigène ont été comprises dans un intervalle variant entre 3,7 µg/ml et 100 µg/ml. Après avoir lavé par deux reprises les plaques avec tampon PBS/tween 20, ont été ajoutés dans chaque puit 200 µl de sérum dilué à 1:200 dans le même tampon, et ce avec le sérum positif et le sérum négatif. Nous avons étudié les variations du temps et de la température d'incubation des plaques elles mêmes, en incubant une plaque en chambre humide pendant deux heures à 37°C et une autre pendant quatre heures à température ambiante. Puis le sérum a été enlevé et les plaques ont été lavées au tampon. L'anti-sérum anti-IgG humain conjugué avec phosphatase alcaline dilué à 1:180 dans le tampon a été réparti à raison de 200 µl dans tous les puits. Après trois heures d'incubation en chambre humide à 37°C, chacune des plaques a été soumise à un nouveau lavage; 200 µl de p-nitrophénylphosphate (1 µg/ml dans diétanolamine à pH 9,8) ont été répartis dans chaque puit et les plaques ont été incubées pendant 30' à 37°C. La réaction a été alors stopée en additionnant NaOH 3N (50 µl).

Resultats et Discussion:

Ainsi que schématisé dans le fig. 1, la concentration optimale de β -glucanes à utiliser est de 30 µm/ml, le temps et la température d'incubation du sérum, respectivement à t.a. et 37°C. En fait, si nous observons comparativement les deux figures, nous pouvons relever que, dans le deux cas, l'augmentation de la concentration de l'antigène était associée à une augmentation des valeurs d'absorption pour les deux sérum de référence. La sensibilité du test dans la différenciation des sérums positifs et négatifs diminue lorsque les concentrations d'antigène sont respectivement inférieures à 30 µm/ml et supérieures à 500 µm/ml. Pour le titrage

du conjugué ont été utilisées des plaques microtiter sensibilisées avec l'antigène à la concentration de 30 µm/ml. La concentration optimale a été déterminée en diluant graduellement (1:25 - 1:200) l'antisérum et en l'essayant contre le sérum positif et le sérum négatif diluis à 1:200. Ainsi qu'il résulte de la figure 2, la différence dans l'absorption entre les deux échantillons se réduisait pour les dilutions inférieures à 1:100. Cette dilution a été jugée optimale. Les résultats obtenus avec le test ELISA appliqué à la recherche de IgG anti β -glucanes nous font penser, contrairement à ce qui est habituellement accepté, que les β -glucanes exercent une action antigénique, induisant la production d'immunoglobulines spécifiques décelées facilement même en quantité minime. L'application de ce test, pour la recherche d'anticorps anti- β -glucanes, dans le sérum de sujets affectés de mycoses muco-cutanées est en train d'être étudiée.

Remerciements: Les Auteurs expriment leurs plus vifs remerciements aux Prof. E. Drouhet et Docteur Delga pour leurs conseils et pour la correction du manuscrit.

Summary: The Authors had determined the possibility to apply the immunoenzymatic test ELISA to valuate anti- β -glucan IgG, and confirmed theres antigenicity.

Resumé: Le Auteurs ont déterminé l'antigenicité de β -glucanes et la possibilité de déceler des anticorpes IgG spécifique avec le test ELISA.

Mots-cles: Antigènes, Candida albicans, IgG anti- β -glucanes, ELISA.

BIBLIOGRAPHIE

1. Lehman P.F. and Reiss E. - Comparison by ELISA of serum anti-Candida albicans mannan IgG levels of a normal population and in diseased patients. Mycopathologia, 1980, 70, 9-93.
2. Meckstroth K.L., Reiss E., Keller J.W. and Kaufman L. - Detection of antibodies and antigenemia in Leukemia patients with candidiasis by Enzyme-linked immunosorbent assay. The Journal of Infectious Diseases, 1981, 144 (1), 24-31.
3. Richardson M.D. and Warnock. - Enzyme-linked immunosorbent assay and its application to the serological diagnosis of fungal infection. Sabouraudia, 1983, 21, 1-14.
4. Cassone A., Marconi P., Bistoni F., Mattia E., Sbaraglia G., Geraci E., Bommassar E. - Immunoadjuvant effects of Candida albicans and its cell wall fractions in a mouse lymphoma model. Cancer Immunol. Immunother., 1981, 10, 181-190.

5. Trevelyan W.E. and Harrison J.S. - Studies on yeast metabolism, yeast carbohydrate fraction, separation from nucleic acids, analysis and behaviour during anaerobic fermentation. Bioch. J., 1956, 63, 22.
6. Herbert D., Phipps P.J. and Strange R.E. - Chemical analysis of microbiol. cells. Methods in Microbiology, 1971, 513, 209.
7. Engvall E. and Perlmann P. - Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Quantitative assay of immunoglobulin. J. Immunochemistry, 1971, 8, 871-874.
8. Leonardi M.S., Gazzara D., Fava C., Focà A. e Mastroeni P. - Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for Streptokinase antibodies. Diagnostic Immunology, 1983, 1, 64-67.

D.O

0,8

0,3

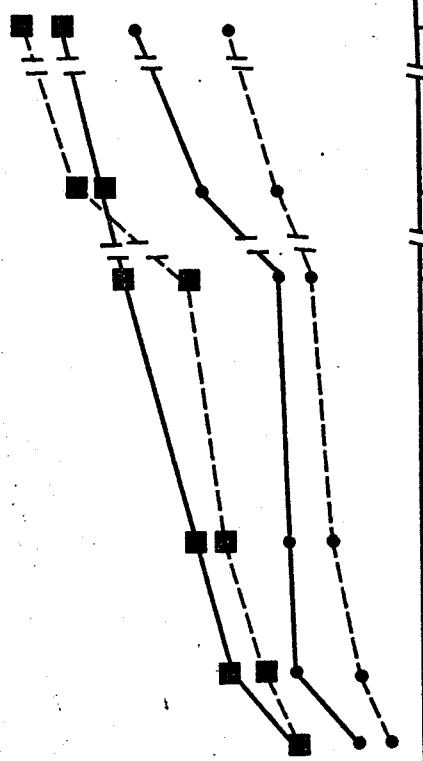


Fig. 1 - Titration of the antigen at 37°C (-) and at ambient temperature (- -) with a negative serum (●) and a positive serum (■).

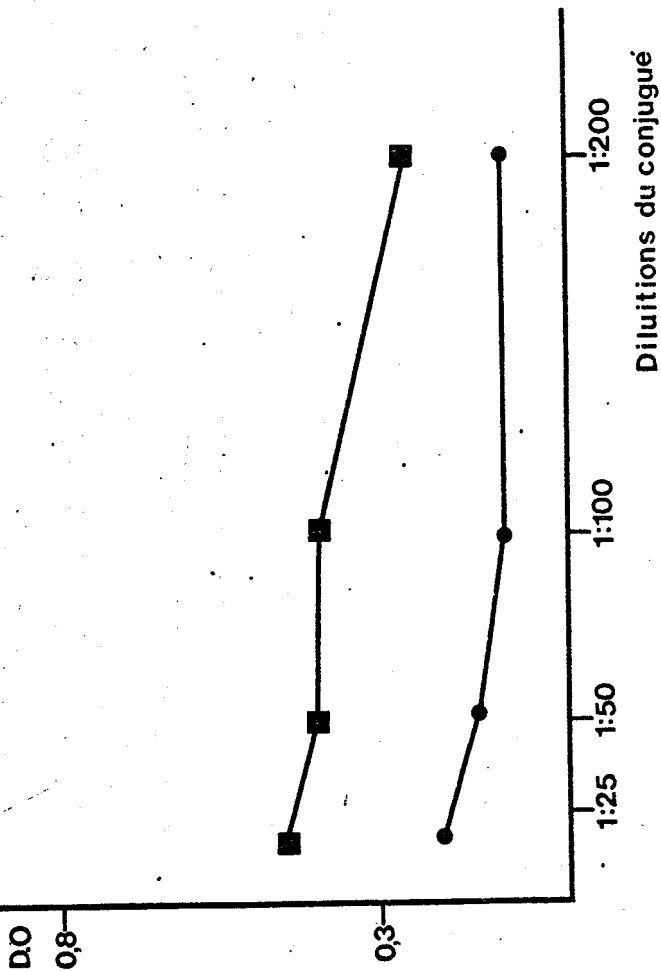


Fig. 2 - Titration du conjugué avec un serum négatif (●) et un serum positif (■).