

REPUBLICQUE DU SENEGAL

MINISTERE DU DEVELOPPEMENT
RURAL ET DE L'HYDRAULIQUE

INSTITUT SENEGALAIS DE RECHERCHES
AGRICOLAS (I.S.R.A.)

DEPARTEMENT DE RECHERCHES SUR LES
PRODUCTIONS ET LA SANTE ANIMALES

LABORATOIRE NATIONAL DE L'ELEVAGE
ET DE RECHERCHES VETERINAIRES
B.P. 2057

DAKAR-HANN

2V0000959

Pathologie : Aïwa
1991

COURS PRATIQUE DE FORMATION AU DIAGNOSTIC
DES HEMOPARASITOSE DU BETAIL
DU 2 AU 28 SEPTEMBRE 1991

A BOBO-DIOULASSO (~~BURKINA~~-FASO)

RAPPORT DE PARTICIPATION

Par

MBAYE MBENGUE

REF. N°051/PARASITO.
OCTOBRE 1991.

P L A N

- I. INTRODUCTION
- II. IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE APPLIQUEE A LA COWDRIOSE (HEARTWATER)
- III. ELISA INDIRECT AVEC ANTICORPS MONOCLONAL POUR IMMOBILISER L'ANTIGENE SUR UN SUPPORT SOLIDE (DETECTION D'ANTICORPS) : MoAb BABESIA BIGEMINA
- IV. ELISAINDIRECT AVEC ANTIGENE FIXE DIRECTEMENT SUR LA MICROPLAQUE (TEST DE CAPTURE D'ANTICORPS)

Ag Babesia bovis
Ag Tbeileria mutans
- V. ELISA DIRECT
(Test de capture d'antigène avec deux anticorps)

MoAb Anaplasma marginale
MoAb Babesia bigemina
- VI. 'DESCRIPTION DU TEST DOT ELISA
- VII. PREPARATION DES CORPS D'INCLUSION D'ANAPLASMA MARGINALE
- VIII. CONCLUSIONS
- IX. REMERCIEMENTS

I. INTRODUCTION

L'une des contraintes majeures au développement de l'élevage est caractérisée par les problèmes de pathologie au sein desquels les maladies hémoparasitaires occupent une place assez importante.

Les résultats de la recherche appliquée doivent nécessairement nous proposer des moyens pour juguler cette pathologie.

Ainsi, sur l'initiative du C.R.T.A. appuyé par l'ILRAD et le Ministère Français de la Coopération, un cours pratique sur les méthodes de diagnostic des hémoparasitoses du bétail a été organisé à Bobo-Dioulasso.

L'immunofluorescence indirecte a été appliquée avec succès dans le diagnostic de la Cowdriose.

Des tests ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) ont été utilisés pour la détection des anticorps et des antigènes circulants dans l'anaplasmose, les piroplasmoses, les trypanosomoses et les theilerioses.

Ces techniques de diagnostic fiables qui nous ont été enseignées seront appliquées dans nos laboratoires afin de palier aux nombreux obstacles à l'amélioration de la santé animale.

II. IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE APPLIQUEE A LA COWDRIOSE (Heartwater)

1. Préparation des lames d'antigènes

L'antigène est constitué de corps élémentaires de *Cowdria ruminantium* provenant de cultures de cellules endothéliales.

Ces corps élémentaires sont conservés congelés à -20°C .

Après décongélation de *Cowdria*, un aliquot est dilué dans du tampon PBS pH 7,4 de 1/1 à 1/20 pour déterminer la dilution optimum, en utilisant un sérum témoin positif. La meilleure dilution est celle pour laquelle il n'y a pas trop de corpuscules fluorescents dans chaque cupule de la lame d'antigène, mais au moins plusieurs *éléments* visibles dans chaque champs du microscope avec un objectif de 50 x.

Avec un peu d'habitude, il suffit de fixer et de colorer au Giemsa la série de dilutions et de rechercher les corpuscules violets avec un microscope normale.

Les corps élémentaires sont dilués dans du PBS à la dilution optimum puis appliqués avec une ~~seringue~~ *seringue* à insuline dans les cupules de lames à IF. Il suffit de 0,5 ml d'antigène dilué pour réaliser 50 lames d'antigène, chacune contenant 21 cupules de 4 mm de diamètre. Avec deux témoins (+ et -) par lame, près de 1 000 sérums peuvent être testés.

Les lames couvertes d'antigène sèchent à température ambiante en 15 mn, puis sont enveloppées de papier filtre, scellées sous plastique et stockées à -20°C .

2. Réalisation du test sérologique

A. Décongélation - Fixation

Les lames sorties du congélateur sont plongées directement dans du méthanol froid pendant 5 mn. Les lames sont ensuite égouttées pendant 5 mn.

B. Incubation des sérums

Les sérums sont dilués au 1/80 dans du PBS et déposés dans chaque cupule, sans oublier les témoins. Préalablement, pour éviter un mélange des sérums, une séparation avec un feutre gras large est dessinées entre chaque cupule. Les sérums sont incubés à 37°C en chambre humide pendant 30 minutes. Une goutte de 25 µl de sérum par cupule.

C. Incubation de l'antiglobuline

Le conjugué utilisé est le R.A.B./F.I.T.C. dilué au 1/100 dans du PBS. Du bleu d'Evans à 1 % est ajouté au conjugué (1/10 000) pour diminuer les fluorescences parasites.

Le conjugué ainsi préparé est centrifugé à 1 000 tours/mn pendant 10 mn pour éliminer les impuretés et recouvert de papier aluminium. Les lames sont lavées pendant 10 mn dans du PBS, puis recouvertes d'une goutte de 25 µl de conjugué/cupule et incubées à 37°C en chambre humide pendant 30 mn.

La dilution optimum de l'antiglobuline est déterminée pour chaque nouveau lot par dilution en série de 1/30 à 1/180.

La meilleure dilution est celle pour laquelle la fluorescence des corpuscules est brillante sans fluorescence parasite.

D. Montage des lames

Les lames sont lavées dans du PBS pendant 10 mn, essuyées et laissées sécher sur du papier filtre pendant 5 mn. Les lames sont montées avec des lamelles sur un liquide de montage (1 volume de Glycérol + 1 volume de tampon PBS) et examinées au microscope à immunofluorescence sur fond noir. La lecture s'effectue dans l'obscurité et sous 24h en utilisant l'objectif 20 x et en réglant le transformateur sur 9 V pour lire les sérums : sont considérés comme positifs, les sérums qui produisent une fluorescence nette des corps élémentaires de *Cowdria ruminantium*.

III. ELISA INDIRECT AVEC ANTICORPS MONOCLONAL POUR IMMOBILISER
L'ANTIGENE SUR UN SUPPORT SOLIDE

MoAb Babesia bigemina (Détection d'anticorps)

Réalisation du test : Avec la microplaque ELISA - Nunc Maxsorp

1. Ajuster la concentration en protéine de l'anticorps monoclonal (AcMO) à la concentration recommandée en appliquant la formule $\frac{RV}{O} =$ volume d'anticorps monoclonal à mettre dans le volume nécessaire (V)

O : concentration originale

R: concentration de travail

V : volume nécessaire pour l'exécution du test

par exemple : O = 10 mg/ml R = 0,5 µg/ml

$$V = 100 \text{ ml on a } \frac{0,5 \times 100}{10 \ 000} = 5 \text{ µl}$$

Prélever 5 µl de l'anticorps monoclonal et le mettre dans 100 ml de tampon PBS pH 7,4

Mettre dans chaque cupule 100 µl de la solution ainsi préparée et laisser le coating se faire à +4°C pendant une nuit.

Les plaques déjà coatées avec l'Acmo peuvent être stockées à -20°C jusqu'à utilisation.

2. Eliminer l'excès d'Ac Mo en tapotant les plaques au dessus d'un évier.
3. Bloquer les sites restant sur les parois de la plaque ainsi que les sites non spécifiques sur les Ac Mo, en mettant 300 µl de lysat de lymphocytes de caprin à 2,5 mg/ml dans du PBS pH 7,4 (exemple 100 ml de lysat + 400 ml tampon PBS dilution au 1/4 du lysat → 2,5 mg/ml)

Diluer les sérums dans une microplaque en même temps que le blocage.

5 µl de sérum + 245 µl de lysat de lymphocyte de caprin + 1 % tween 20 → Dilution du 1/50 des sérums.

Les plaques sont incubées à + 4°C pendant une nuit.

.../...

4. Eliminer l'excès de la solution de blocage en tapotant les plaques au-dessus de l'évier et laver 3 fois avec du tampon de lavage : le lavage n'est pas nécessaire.

5. Ajouter 100 µl/cupule de la solution antigénique de Babesia bigemina à une concentration de 2 à 5 µg/ml.

Exemple : $C = 300 \text{ µg/ml}$ $R = 7,5 \text{ µg/ml}$ $V = 125 \text{ ml}$ $\frac{RV}{C} = 3,125 \text{ ml}$

Prélever 3,125 ml Ag Babesia bigemina et le mettre dans 125 ml de tampon PBS pH 7,4 + Tween 20.

Recouvrir les plaques avec du papier adhésif et incuber à 37°C pendant 30 mn en agitant toutes les 5 mn.

6. Eliminer l'excès de solution antigénique et laver 10 fois les plaques avec le tampon de lavage (Tpon PBS + Tween 20)

Laver 5 fois les plaques avec du tampon PBS pH 7,4 sans Tween 20.

7. Bloquer les sites non spécifiques sur l'antigène capturé en remplissant les puits avec 300 µl de lysat de lymphocyte de caprin à une concentration de 2,5 mg/ml et incuber 1 heure à 37°C.

8. Eliminer la solution de blocage et ajouter 100 µl de sérum dilué au 1/50, en double aux puits. Recouvrir les plaques et incuber à 37°C pendant 30 mn en agitant toutes les 5 mn.

9. Enlever les anticorps non fixés en tapotant les plaques au dessus de l'évier. Laver 5 fois les plaques, puis remplir les puits de tampon de lavage (PBS + Tween 20) et laisser 15 mn à la température ambiante. Refaire le même lavage et laver enfin les plaques 5 fois.

10. Mettre dans chaque cupule 100 µl de conjugué dilué dans le lysat de lymphocyte. Exemple : Pour une dilution au 1/3000 du conjugué, prendre

50 µl de conjugué anti Ig G1

50 µl de conjugué anti Ig G2

50 µl de conjugué anti IgM

et mélanger à 150 ml de tampon PBS → dilution au 1/1500, ajouter 150 ml de lysat de lymphocyte caprin à 2,5 mg/ml → Dilution du conjugué au 1/3000.

Recouvrir les plaques idem 8 et incuber à 37°C pendant 30 mn en agitant toutes les 5 mn.

11. Enlever le conjugué non fixé en tapotant les plaques au dessus de l'évier et laver idem 9.
12. Ajouter 100 µl de solution substrat/chromogène à tous les puits et laisser à la température ambiante à l'obscurité pendant 1 heure en agitant toutes les 10 mn.
13. Déterminer la densité optique à 414 nM.

IV. ELISA INDIRECT AVEC ANTIGENE FIXE DIRECTEMENT SUR LA MICROPLAQUE

(Test de capture d'anticorps)

La capture d'anticorps peut être utilisée pour détecter et quantifier les anticorps dans les fluides corporels, le sérum par exemple,

Le protocole est simple : un antigène est immobilisé sur un support solide tel qu'une microplaque, et l'anticorps peut se fixer à l'antigène.

Cet anticorps peut alors être détecté par un anticorps secondaire, marqué avec une enzyme et qui reconnaît spécifiquement le premier anticorps. La quantité d'anticorps liés détermine la force du signal.

Technique : Avec la microplaque ELISA Nunc Poly sorp.

1. Ajuster la concentration en protéines de l'antigène avec la formule $\frac{RV}{O}$ le volume obtenu est celui que vous prenez à partir du matériel original et que vous transformez en volume nécessaire

Exemple : Si $O = 200 \mu\text{g/ml}$

$$R = 5 \mu\text{g/ml}$$

$$V = 120 \text{ ml}$$

$$\frac{RV}{O} = \frac{5 \times 120}{200} = 3 \text{ ml à mettre dans 120 ml de tampon PBS}$$

Mettre dans chaque cupule 100 μl de la solution ainsi préparée et laisser le coating se faire à $+4^\circ\text{C}$ pendant une nuit,

2. Eliminer l'excès d'antigène en tapotant la plaque sur l'évier.
3. Bloquer les sites restant sur les parois de la plaque ainsi que les sites non spécifiques sur l'antigène lié en remplissant les puits avec 300 μl d'un lysat de lymphocytes de chèvre à 2,5 mg/ml dans du PBS pH 7,4 et incubé à $+4^\circ\text{C}$ pendant une nuit. Faire en même temps la dilution des sérums au 1/50 (5 μl de sérum + 245 μl de lysat de lymphocyte + Tween 20).

Eliminer l'excès de protéine bloquant en tapotant la plaque au dessus d'un évier et laver 3 fois les plaques avec un tampon de lavage (PBS pH 7,4 avec 0,1 % de Tween 20).

4. Mettre 100 μ l de sérum dilué au 1/50, en double à chaque puits. Recouvrir les plaques en incubant à 37°C pendant 1 heure en agitant toutes les 10 mn.
5. Enlever les anticorps non fixés en tapotant les plaques au dessus d'un évier. Laver 5 fois avec le tampon de lavage (PBS pH 7,4 1- 0,5 % Tween 20) puis remplir les puits avec le tampon de lavage et laisser 15 mn à la température ambiante. Relaver les plaques et laisser tremper encore 15 mn dans le tampon. Laver encore 5 fois les plaques.
6. Ajouter 100 μ l de conjugué convenablement dilué dans le lysat de lymphocyte caprin à tous les puits.
Exemple : Conjugué au 1/3000 : 150 μ l de conjugué mère + 150 ml de Tpon
PBS + 0,5 % Tween 20 + 150 ml de lysat de lymphocyte.
Couvrir les plaques et incubant encore à 37°C pendant 1 heure en agitant les plaques toutes les 10 mn.
7. Enlever le conjugué non fixé en tapotant les plaques au dessus de l'évier et en lavant idem 5.
8. Ajouter 100 μ l de solution substrat/chromogène (500 μ l H₂O₂ + 500 μ l ABTS dans 50ml de tampon citrate) et laisser incubant à la température ambiante dans le noir pendant 1 heure en agitant toutes les 10 mn.
9. Déterminer la densité optique au lecteur ELISA à 414 nm.

.../...

V. ELISA DIRECT (Capture d'antigène avec deux anticorps)

L'ELISA Sandwich avec 2 anticorps est un des tests immunologiques les plus utilisés surtout pour détecter la présence d'antigènes circulants dans le sérum. Le test est beaucoup plus sensible si les anticorps monoclonaux capteurs reconnaissent différents épitopes sur la molécule d'antigène.

Il est même meilleur si les épitopes reconnus par les AcMo sont différents de ceux reconnus par les anticorps de l'hôte induits au cours de l'infection.

Pour utiliser le sandwich, un anticorps monoclonal est lié au support solide et l'antigène à tester est laissé se fixer. Les protéines non fixées sont enlevées par lavage et le second anticorps monoclonal se fixe à l'antigène. Après lavage, le test est quantifié en ajoutant une solution de substrat/chromogène.

Les avantages moyens de cette technique sont que l'antigène ne doit pas être purifié avant le test.

Le désavantage majeur est qu'il faut du temps pour produire les anticorps monoclonaux.

1. Composition des tampons

- Tampon de coatin. : P.B.S. pH 7,4
- Blocage : solution de lait écrémé en poudre à 10 p.100 dans P.B.S. pH 7,4
- Dilution des sérums et du conjugué : solution de lait écrémé en poudre à 10 p.100 dans P.B.S. pH 7,4 + 0,1 % Tween 20
- Lavage : solution tampon P.B.S. pH 7,4 + 0,1 % Tween 20
- Substrat/Chromogène
 - > Tampon substrat : Acide citrique - 9,6 g
Eau A 1,0 litre
Ajuster le pH à 4,0 avec Hydroxyde de Na 3M
Conserver à la température ambiante et vérifier le pH juste avant utilisation

-> Chromogène : Poudre ABTS 0,27 g
 eau A12,5 ml
 Mélanger vigoureusement et conserver à +4°C dans
 un récipient foncé

—> Substrat : H₂O₂ (30 %) 500 µl
 eau A7,5 ml
 Conserver comme pour le chromogène

-> Faire le mélange substrat/chromogène de la façon suivante :
 Tampon substrat 25 ml
 Substrat100 µl
 Chromogène125 µl

-> Kit-Elisa pour le diagnostic de Anaplasma marginale ILRAD 91

– Anticorps monoclonal : $\theta = 11,5 \text{ mg/ml}$ $R = 10 \text{ µg/ml}$ dans
 un volume x

– Conjugué anti MoAb : faire la dilution au 1/2000

Exemple : 7,5 µl de solution mère conjugué dans 15 ml de Tampon

-> Kit -Elisa pour le diagnostic de Babesia bigemina ILRAD 91

– Anticorps monoclonal : $\theta = 10 \text{ mg/ml}$ $R = 5 \text{ µg/ml}$ dans un
 volume x

Evaluer le volume x nécessaire et appliquer la formule $\frac{RV}{\theta}$ pour savoir
le volume de MoAb à mettre dans le volume x pour avoir la concentra-
tion de travail (5 µg/ml).

– Conjugué anti-MoAb : A diluer au 1/2000

Exemple 7,5 µl de solution mère de conjugué dans 15 ml de tampon.

2. Réalisation du test : Avec les plaques micro ELISA Nunc ou Dynatec,

- a) Ajuster la concentration en protéines de l'Ac Mo non marqué en utilisant la formule $\frac{RV}{O}$ si $O = 11,5 \text{ mg/ml}$ $R = 10 \text{ } \mu\text{g/ml}$

V = volume nécessaire pour tester x sérums

Pour tester 45 sérums (1 plaque), il faut 1 volume V de

$150 \text{ } \mu\text{l} \times 100 = 15 \text{ ml} \approx 20 \text{ ml}$; pour 10 plaques, il faut $V = 200 \text{ ml}$: la

quantité x à prélever sur la solution mère d'Ac Mo est de :

$$\frac{10 \times 200.000}{11.500} = 170 \text{ } \mu\text{l} \text{ dans } 200 \text{ ml de PBS pH } 7,4.$$

- b) Fixer l'anticorps monoclonal dans chaque cupule en ajoutant $150 \text{ } \mu\text{l}$ de solution Ac Mo. laisser le coating se faire à $+4^{\circ}\text{C}$ pendant une nuit. Si on veut différer le test, stocker les plaques déjà coatées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

- c) Vider la plaque pour éliminer l'excès d'Ac Mo non fixés.

- d) 1er blocage : mettre $300 \text{ } \mu\text{l}$ du tampon de blocage/cupule et laisser à $+4^{\circ}\text{C}$ pendant une nuit.

Faire en même temps la dilution des sérums ($125 \text{ } \mu\text{l}$ de sérum + $125 \text{ } \mu\text{l}$ de tampon ; incuber la plaque de dilution des sérums à $+4^{\circ}\text{C}$ de dilution) dilution au $1/2$ pendant une nuit.

- e) Vider la plaque test contenant le tampon de blocage.

- f) Ajouter $100 \text{ } \mu\text{l}$ de sérum à tester : 2 cupules/sérum.

- g) Laisser les plaques à la température ambiante 30 mn.

- h) Vider la plaque.

- i) 2è blocage : $300 \text{ } \mu\text{l}$ de tampon de blocage/cupule et laisser 1 heure à la température ambiante.

- j) Préparer le conjugué en le diluant au $1/2000$: exemple $7,5 \text{ } \mu\text{l}$ de conjugué dans 15 ml de tampon de dilution.

k) Vider la plaque, ajouter 100 μ l de conjugué/cupule et laisser à la température ambiante en agitant toutes les 5 mn pendant 30 mn.

l) Vider la plaque.

m) Lavage : - Rincer 5 fois, recouvrir de tampon lavage et laisser 15 mn
- Rincer 3 fois, WI' - " - " - " - "

n) Vider la plaque.

o) Préparer le substrat/chromogène

500 μ l H_2O_2 + 500 μ l ABTS dans 50 ml de solution tampon citrate pH 4,0
Mettre 100 μ l du mélange substrat/chromogène dans chaque cupule.
Déposer la plaque sur le rocker 2 mn pour bien homogénéiser et laisser
1 heure à la température ambiante et à l'obscurité.

p) Faire la lecture des densités optiques au lecteur ELISA.

Ce test a été utilisé dans le diagnostic de l'anaplasmose à *Anaplasma marginale*, mais aussi dans le diagnostic de la babesiose à *Babesia bigemina* chez les bovins.

VI. DESCRIPTION DU TEST DOT-ELISA

Test de détection d'anticorps.

Déterminer la meilleure concentration en antigène pour le test par un titrage (en général, la meilleure concentration en protéines est de 1 à 2 mg/ml).

- a) Déposer les cercles de nitrocellulose (B10-RAD 0,45 μ m) dans les cupules de la plaque à l'aide d'une pince.
- b) Avec des gants, mettre 1 μ l d'antigène sur la nitrocellulose et laisser sécher 5 mn à la température ambiante.
- c) Blocage : Mettre du tampon de blocage (PBS pH 7,4 + 0,5 % tween 20) environ 200 à 300 μ l/cupule et laisser 15 mn à la température ambiante.
Diluer en même temps les sérums au 1/200 dans PBS Tween 20 0,1 %.
- d) Enlever le tampon de blocage et ajouter 100 μ l de sérum dilué/cupule, incuber 1 heure à la température ambiante.
- e) Laver 4 fois 5 mn avec le tampon PBS + 0,1 % Tween 20.
- f) Ajouter 100 μ l du conjugué phosphatase Alcaline-Protéine A dilué au 1/500 dans PBS + 0,1 % Tween 20 par cupule et incuber 30 mn à la température ambiante.
- g) Laver idem e, puis lavage final seulement avec du PBS (sans Tween 20).
- h) Mettre 100 μ l de substrat BCIP/NBT dans le tampon Tris.
- i) Stopper la réaction avec du PBS contenant 200 mM EDTA.
- j) Sécher la nitrocellulose.
Faire la lecture des résultats à l'oeil nu : la réaction positive est caractérisé par l'apparition d'un cercle violacé dans la nitrocellulose.

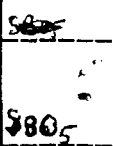
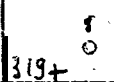
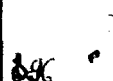
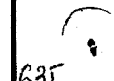
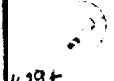
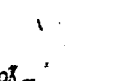
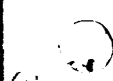
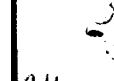
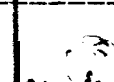
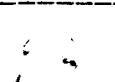
17

DOT-ELISATEST: PLATE LAYOUT

TEST Avaflavina marginale

Date: 28/9/91

Plate No: II

	1	2	3	4	5	6
A						
B						
C						
D						

Notes _____

Signature: Mbaye MAREN GUE,

VII. PROTOCOLE DE PREPARATION DES CORPS D'INCLUSION D'ANAPLASMA MARGINALE

1. Source de sang infecté

- a) Inoculer **2 - 4** ml de la souche d'**A.marginale** à un veau sensible splenectomisé en I.V.
- b) Pour obtenir un meilleur pourcentage de globules rouges parasités (P.G.P.) avec un hématocrite de 16 à 18 %, des passages successifs sont recommandés, Quand le P.G.P. atteint 20 à 30 p.100, du sang hépariné ($\approx$ 250 ml) est transfusé à un second veau splenectamisé. Avec un troisième veau, l'incubation est considérablement raccourcie.
- c) Avec un P.G.P. $\geq$ 70 % et un hématocrite de 16 - 18 %, récolter le sang. N'importe quel anticoagulant peut être utilisé par exemple l'E.D.T.A. à 1 g/l de sang.

2. Traitement du sang pour la préparation de l'antigène

- a) Traiter rapidement le sang après sa récolte et le centrifuger à 2 500 - 3 000 tours/mn pendant 20 mn à + 4°C.
Rejeter le plasma et le buffy coat.
- b) Laver les globules rouges infectées 3 fois avec un tampon choline (chlorure de choline 155 mM, HEPES pH 7,5 5 mM) ou du sérum salé physiologique.
- c) Ajouter 2 ml de sérum salé à 1 ml de G.R. (1/3) et soniquer pour rompre 75 à 85 % des cellules en évitant de surchauffer le lysat.
Pour lyser complètement les cellules, congeler et décongeler rapidement le sonicat 3 fois.
- d) Centrifuger le lysat à 10 000 g/30 mn/4°C et récolter le culot.
- e) Laver vigoureusement le culot 4- 5 fois jusqu'à élimination de la majorité de l'hémoglobine (avec 20 volumes de sérum salé à 10 000 g/30 mn/+ 4°C).

- f) Remettre en suspension le culot lavé dans un petit volume de sérum salé et homogénéiser avec un broyeur de tissu en verre jusqu'à passer le culot à travers une aiguille 26 g.

3. Gradient de Percoll pour isoler les corps d'inclusion d'A. marginale

- a) Dans une éprouvette graduée, ajouter successivement :

- 25 ml Percoll (SIGMA ou PHARMACIA)
- 10 ml Tampon K-1, 10 x
- 2 ml HEPES 1 M
- eau distillée qsq 100 ml

bien mélanger pour obtenir une suspension de Percoll à 25 p.100.

- b) Ajouter 10 à 30 ml de suspension de Percoll dans des tubes en polycarbonate de 15 ou 50 ml.
- c) Ajouter (avec une pipette Pasteur) lentement et soigneusement, sans perturber le Percoll, 2 ou 6 ml de préparation brute d'**Anaplasma** sur le dessus du Percoll.
- d) Centrifuger à 24 000 g/60 mn/4°C. Récolter la couche d'inclusion.
- e) Laver 2 fois avec du PBS pH 7,4 la fraction collectée, à 30 000 g/20 mn.

Formule des tampons

K-1 - 10 x

NaCl	3,3 g
KCl	4,4 g
NaH ₂ PO ₄	0,14 g
K ₂ HPO ₄	1,57 g
NaHCO ₃	0,9 g
QSP 100 ml H ₂ O	

P.B.S. pH 7,4

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
Thimerosal	0,1 g
QSP 1 l H ₂ O	

.../...

VIII. CONCLUSIONS

Ce cours nous a permis d'approfondir nos connaissances sur le séro-diagnostic des hémoparasitoses du bétail.

De nouvelles techniques de détection d'anticorps et d'antigènes telles que la DOT-ELISA et l'ELISA SANDWICH nous ont donné d'excellents résultats à partir de sérums de bovins et doivent être adaptées à nos programmes de recherche en cours.

IX. REMERCIEMENTS

Une parfaite disponibilité a été manifestée par les autorités du C.R.T.A. Nous adressons les remerciements les plus sincères :

- Au Dr Saydil Moctar TOURE, Directeur du C.R.T.A. pour l'accueil chaleureux qu'il nous a réservé de même que la très bonne organisation du cours.
- Au Dr Gérard DUVALLET pour l'assistance continue qu'il a toujours manifesté à notre égard.
- Au Dr Emmanuel CAMUS, Directeur du cours pour son dévouement, sa modestie qu'il n'a jamais ménagé afin de nous enrichir les connaissances scientifiques.

Ces remerciements s'adressent aussi au corps professoral en particulier

- le Pr Gerrit UILENBERG, Directeur Scientifique de l'IEMVT pour la qualité des sujets traités,
- les Drs V.M. NANTULLIA et Joseph KATENDE de l'ILRAD qui nous ont détaillée les techniques ELISA avec beaucoup plus de clarté,
- le Dr MONTENEGRO James de l'Université de Tulane pour la nouvelle technique DOT ELISA enseignée,
- Au Ministère Français de la Coopération de nous avoir octroyé une bourse qui nous a permis d'assister à ce cours.
- A tout le personnel scientifique et technique du C.R.T.A. pour la parfaite collaboration qu'il a toujours témoigné pour le bon déroulement de nos séances de travaux pratiques,
- Au Directeur Général de l'ISRA et au Directeur des Recherches sur les Productions et la Santé animales de nous avoir autorisé à participer à ce cours de formation.