

112
8/1/87

Centro Interamericano de
Documentación e
Información Agrícola

13 AGO 1987

IICA — CIDIA

SEMINAIRE SUR LA SANTE ANIMALE

THEME

DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE DES MALADIES ANINALES

marndr-damien

4-8 nov. 1985

MARNDR
IICA
USAID
USDA

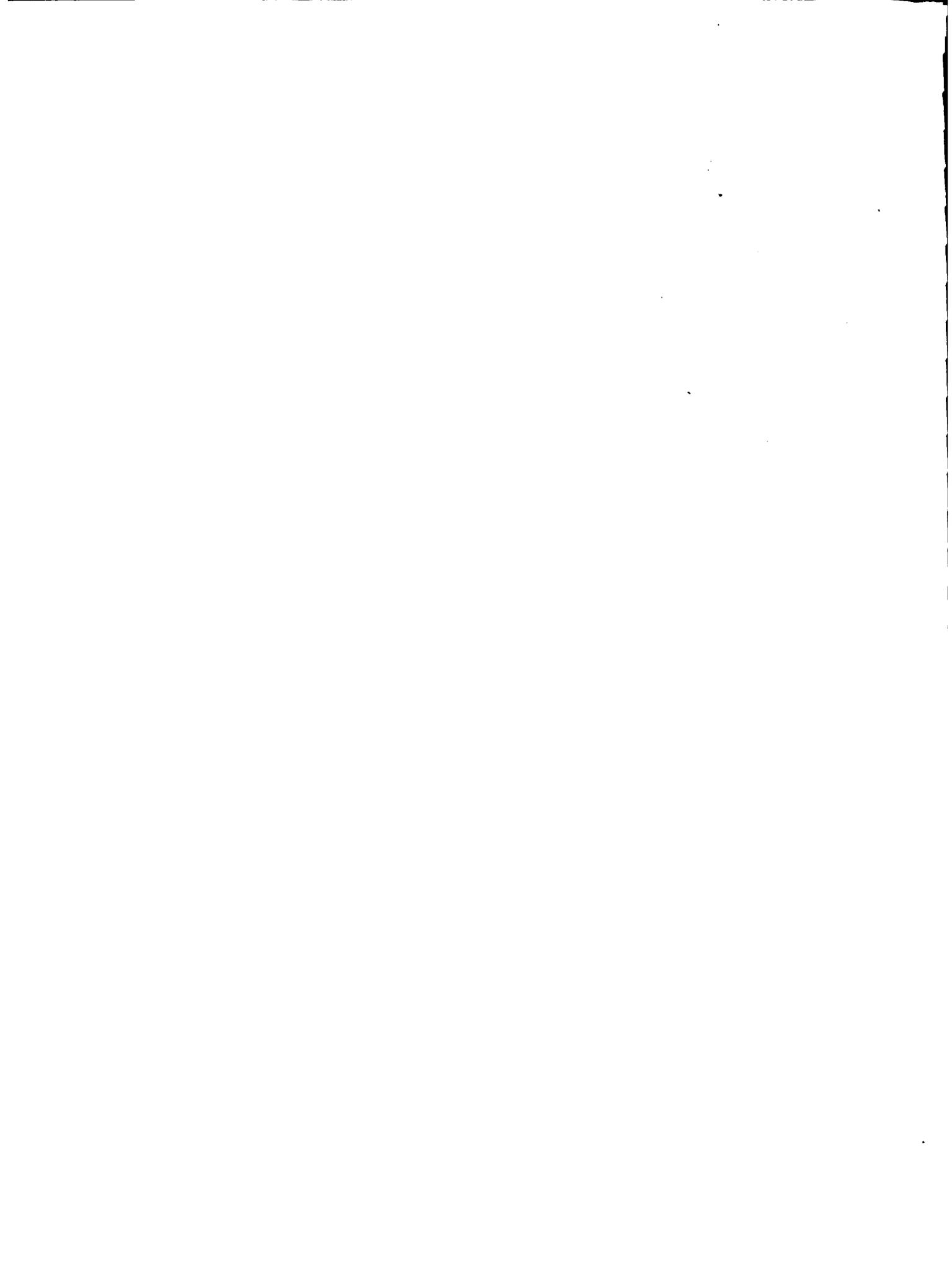
IICA
PM-651

pub. misc. ✓

651 ISSN-0534-5391



10-11-1911





13/11/85
IICA - GINIA

SEMINAIRE SUR LA SANTE ANIMALE

THEME

DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE DES MALADIES ANINALES

marndr-damien

4-8 nov. 1985

**MARNDR
IICA
USAID
USDA**

pub. misc.

651 ISSN-0534-5391

00008368

~~0000664~~

MINISTERE DE L'AGRICULTURE DES RESSOURCES NATURELLES ET DU DEVELOPPEMENT
RURAL, MARNDR

INSTITUT INTERAMERICAIN DE COOPERATION POUR L'AGRICULTURE, IICA

SEMINAIRE SUR LA SANTE ANIMALE

THEME:

Diagnostic de Laboratoire des maladies animales

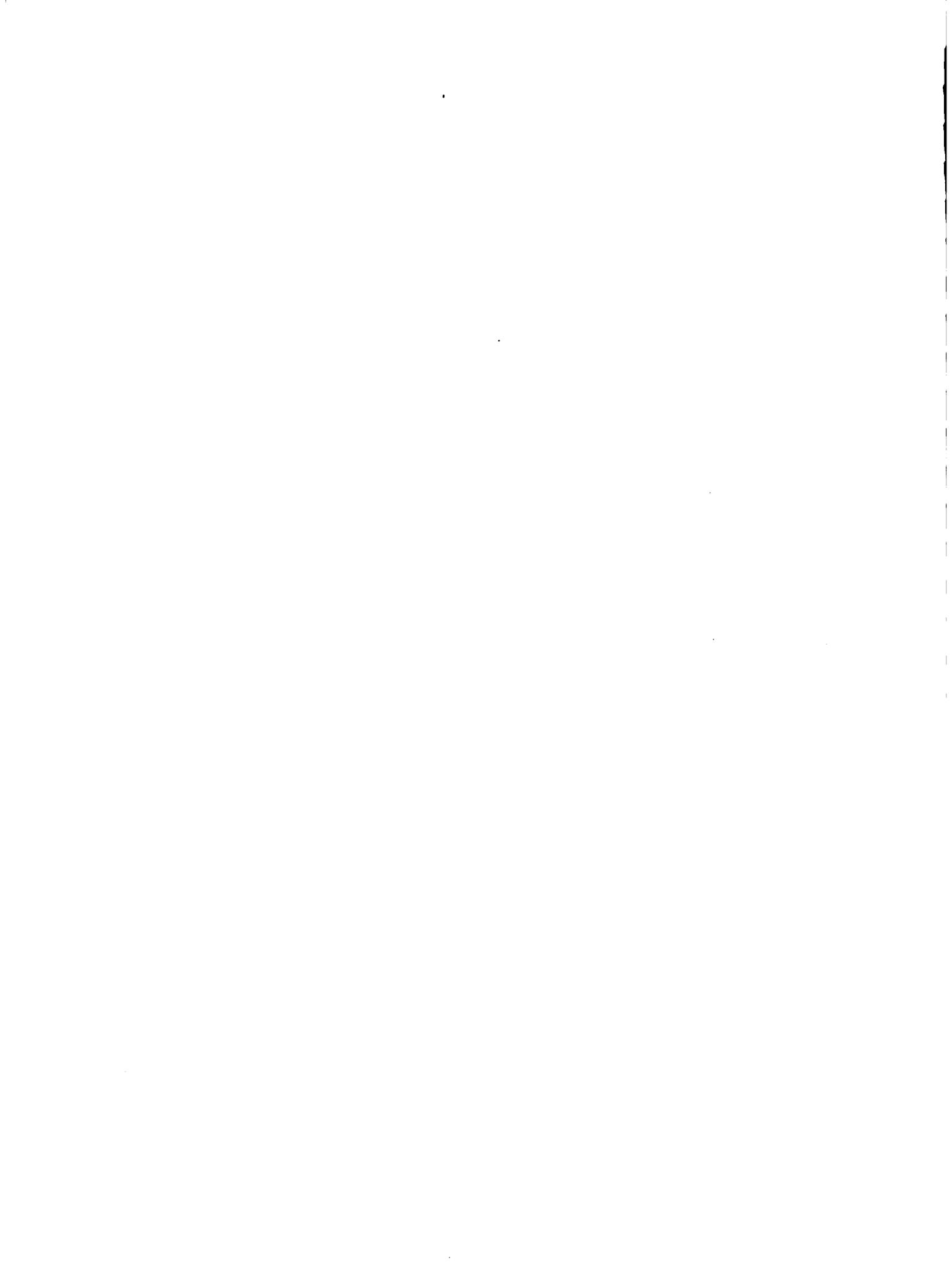
Séminaire organisé dans le Laboratoire de Diagnostic du MARNDR du
4 au 8 Novembre 1985.

COORDONATEURS:

Dr. Max Millien, MARNDR

Dr. Cesar Lobo A, IICA
(Aspects Techniques)

Ing. Esteban Fernandez, IICA
(Aspects Administratifs)



CONFERENCIERS

Dr. César A. Lobo, MVZ, M.Sc, Ph.D.

Dra. Consuelo Zapata, M.V.

Dr. Frantz Alexander, M.V.

Dr. Max Millien, M.V.

Melle Maryse Timothée

Liste des Participants

Maryse Timothée

Magaly Stanislas

Marie Louise Robillard

Carine Jean François

Mireille Abellard

Carole Bernadel

Jean Vilaire Desjardins

Jean Etienne

Lionel Massillon

Marc Dessonvil

PREMIERE PARTIE: CONCEPTS GENERAUX:

Prélèvements d'échantillons pour le diagnostic des maladies animales.

Stérilisation.

Désinfection.



COLLECTE D'ÉCHANTILLONS POUR LE DIAGNOSTIC DES MALADIES ANIMALES

La garantie d'un bon diagnostic dépend de la réalisation des examens de laboratoire respectifs, grâce auxquels on détermine la cause de la maladie; ces examens dépendent de façon fondamentale non seulement de la sélection adéquate et correcte de l'échantillon mais aussi de sa collecte et de son envoi au laboratoire.

Recommandations Générales

1. Au laboratoire on peut envoyer des animaux malades (qui présentent des symptômes avancés de la maladie) des organes, des tissus, des sécrétions, des fluides du corps, des parasites, etc.
2. Le procédé à suivre varie avec le genre d'analyse qu'on désire réaliser; il existe des échantillons pour les examens parasitologiques, bactériologiques, virologiques, pathologiques, toxicologiques, etc.
3. On doit prélever les échantillons d'un animal récemment mort de la maladie qu'on est en train de considérer, ou à défaut d'un animal tué qui présente les symptômes de la maladie de manière avancée.

Pour certaines espèces, étant donné leur dimension, il est préférable d'envoyer certains échantillons; cependant pour ce qui a trait aux oiseaux et aux petits animaux, il serait toujours mieux de remettre l'animal entier.

4. On ne doit pas envoyer d'échantillons de cadavres qui ont plus de dix heures dans cet état parce qu'ils ne sont pas appropriés pour la recherche des microorganismes.
5. Afin d'éviter les contaminations au cours des nécropsies, les échantillons pour les recherches bactériologiques et virologiques doivent être prélevés antérieurement à ceux qu'on utilisera pour les recherches parasitologiques et histopathologiques.

De toutes les façons, les échantillons seront prélevés avec des instruments stériles; cette stérilisation doit être faite à l'autoclave ou au four, ou bien durant 15 minutes. Aussi, on peut stériliser les instruments avec de l'alcool et ensuite les flamber.

6. Les flacons qu'on utilise pour la remise des échantillons doivent être au préalable stérilisés.

On devra envoyer dans des flacons séparés chaque échantillon de tissu; d'organe, de parasite etc. Cette recommandation est d'une grande importance, surtout quand il s'agit des échantillons qui seront utilisés pour les examens bactériologiques et virologiques, à cause du risque de contamination.

7. Avant d'effectuer un envoi pour les recherches bactériologiques et virologiques, on doit considérer le temps que l'on prendra pour faire arriver l'échantillon au laboratoire, duquel dépendra la fa-



çon d'envoyer. Dans le cas des oiseaux par exemple, s'il s'agit d'un lieu proche (1 heure) on envoie le cadavre, si la zone est distante (6-8 heures) on envoie l'oiseau malade; et si la distance est plus longue, on envoie les échantillons de tissus et d'organes.

8. Tout échantillon doit être accompagné du protocole respectif de nécropsie et de l'histoire clinique qui se fera de la façon suivante:

L'espèce animale, race, sexe, âge et identification.

Origine: lieu, province, département.

Nom du propriétaire de l'animal .

Nom et adresse de l'expéditeur.

Date: jour et heure du prélèvement.

Genre d'échantillon qu'on envoie (tissu, organe, etc).

Nombre d'animaux malades et durée de la maladie.

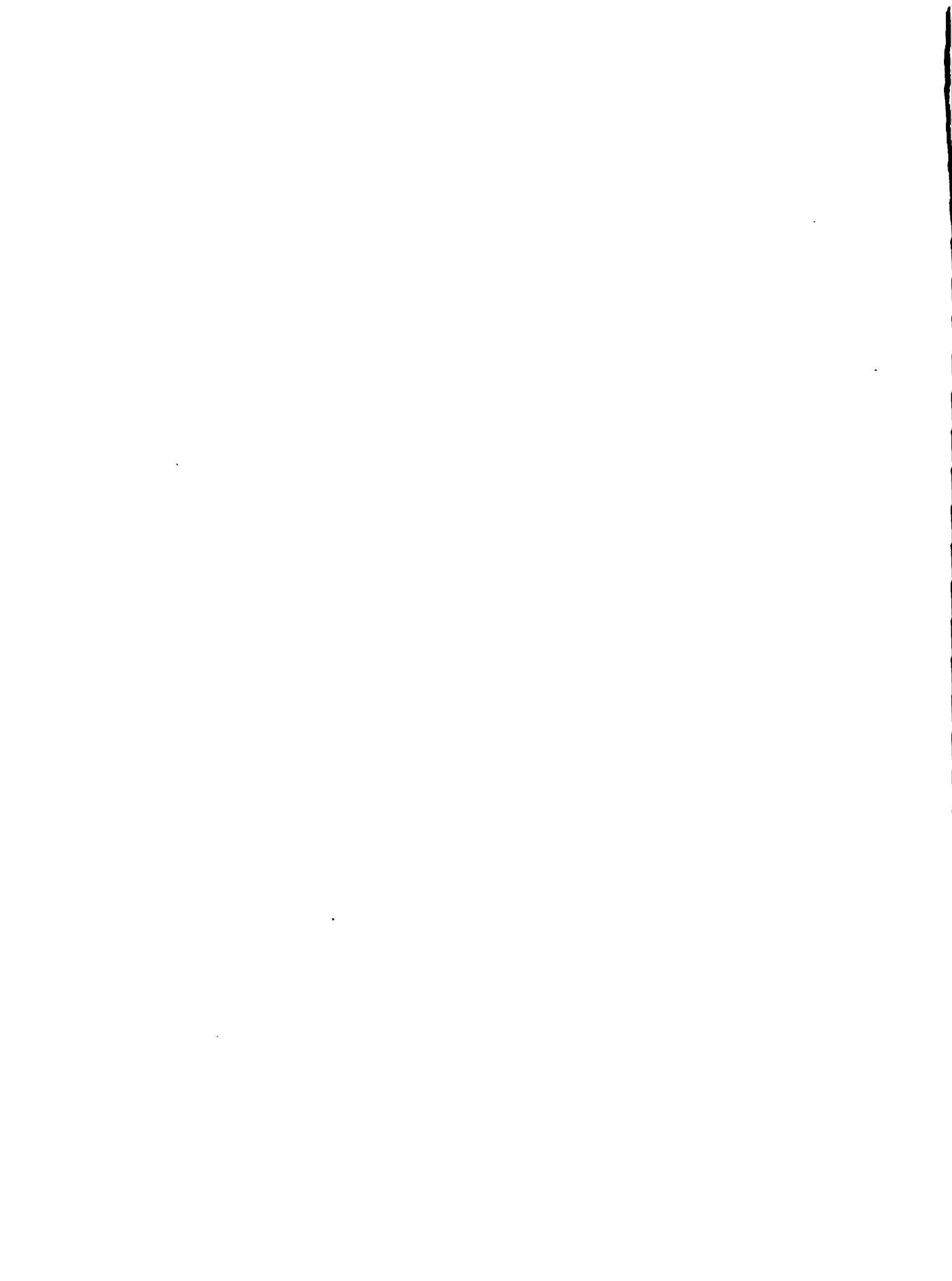
Nombre d'animaux morts.

Description brève des symptômes cliniques.

Diagnostique.

Vaccins appliqués et date des vaccinations et aussi les traitements.

Dans les cas d'urgence, on mettra au courant le Centre National de Pathologie Animale (CNDA) l'envoi de l'échantillon et le transporteur.



ECHANTILLONS POUR L'EXAMEN HISTOPATHOLOGIQUE

Les échantillons pour l'étude histopathologique doivent avoir la forme d'un cube d'à peu près de deux centimètres de côté, et en plus qu'on aie le soin d'inclure dans ce fragment non seulement le tissu affecté mais encore le tissu apparemment sain.

On doit envoyer dans une solution de formol à 10 % en utilisant 8 à 10 fois de solution en rapport avec le volume du tissu.

Echantillons de Sang

Si le sang est pour l'examen hématologique, on prélèvera deux échantillons : l'un (15 cc de sang) dans un petit flacon stéril contenant de l'anticoagulant et l'autre sur une lame de verre (frottis).

Chez le bétail: bovin, équin, ovin et caprin, on prélève le sang à partir de la veine jugulaire. Chez les ovins et les caprins le sang peut être prélevé à partir de la veine radiale gauche qui est de plus grand calibre que la veine droite. Pour cela on utilise une seringue et une aiguille de calibre 18. Chez le porc on recueille le sang à partir de la veine antérieure. Chez le chien, on prélève à partir de la veine radiale ou de la saphène.

Le frottis se prépare avec une goutte de sang qu'on dépose à l'extrémité d'une lame de verre (porte-objet) au moyen d'une autre lame on procède à l'extension qui doit être fine, uniforme et desséchée en milieu ambiant.

A l'aide d'objets pointus on note l'identification dans le frottis même; les extensions trop épaisses ne sont pas appropriées pour les examens.

Si le sang est destiné à la séro-agglutination (leptospirose, brucellose, etc.) on prélève dans des flacons ou tubes stériles (sans anticoagulant). Il est préférable d'envoyer du sérum au lieu du sang entier, étant donné qu'au cours du transport se produit l'hémolyse; le sang hémolysé n'est pas convenable pour l'analyse.

Echantillons d'Urine

L'urine peut être obtenue au cours de la miction ou par sondage. Les flacons doivent être propres et stérilisés. On recueillera au moins 50 cc d'urine. L'extraction d'urine se fera dans la plus grande asepsie possible, en évitant toute contamination, surtout quand l'urine est destinée à l'examen bactériologique; dans ce cas, l'envoi se fera sous réfrigération.

Sperme

Le sperme peut être extrait à l'aide d'un électroéjaculateur, ou à l'aide d'un vagin artificiel= tout de suite, il faut le mettre dans des flacons stérilisés, sans ajouter aucun préservatif et le mettre sous réfrigération avec de la glace et du sel.



Matières Fécales

Pour l'examen bactériologique, les matières fécales doivent être prélevées manuellement du rectum et placées immédiatement au réfrigérateur. Il faut s'arranger pour qu'elles arrivent au laboratoire dans un délai de 24 heures au maximum.

La remise des matières fécales pour l'examen parasitologique s'annote dans la partie correspondante à l'envoi des échantillons pour ce type d'examen.

Lait

L'envoi du lait est décrit dans le chapitre qui fait référence à la mastite et à la brucellose.

Ensuite on indique la façon de réaliser la collecte et la remise des échantillons pour les examens bactériologiques, virologiques et toxicologiques par maladies.

On trouvera aussi une description de ces maladies.

DESINFECTION

Destruction partielle des populations microbiennes.

Méthodes : Physiques et Chimiques

Agents Chimiques : Biostatiques ou Biocides

TYPES DE DESINFECTANTS CHIMIQUES

a) A base de mercure: Application limitée:

Fongicides dans les préservatifs industriels. Biocides

b) Composants d'ammonium quaternaire très efficaces pour les cellules végétatives. Ne sont pas compatibles avec les savons.

c) Halogènes (chlore, Iode, Brome)

Chlore : Réduction de contamination de l'eau.

Dans l'eau: Chlore ———> acide hypochloreux

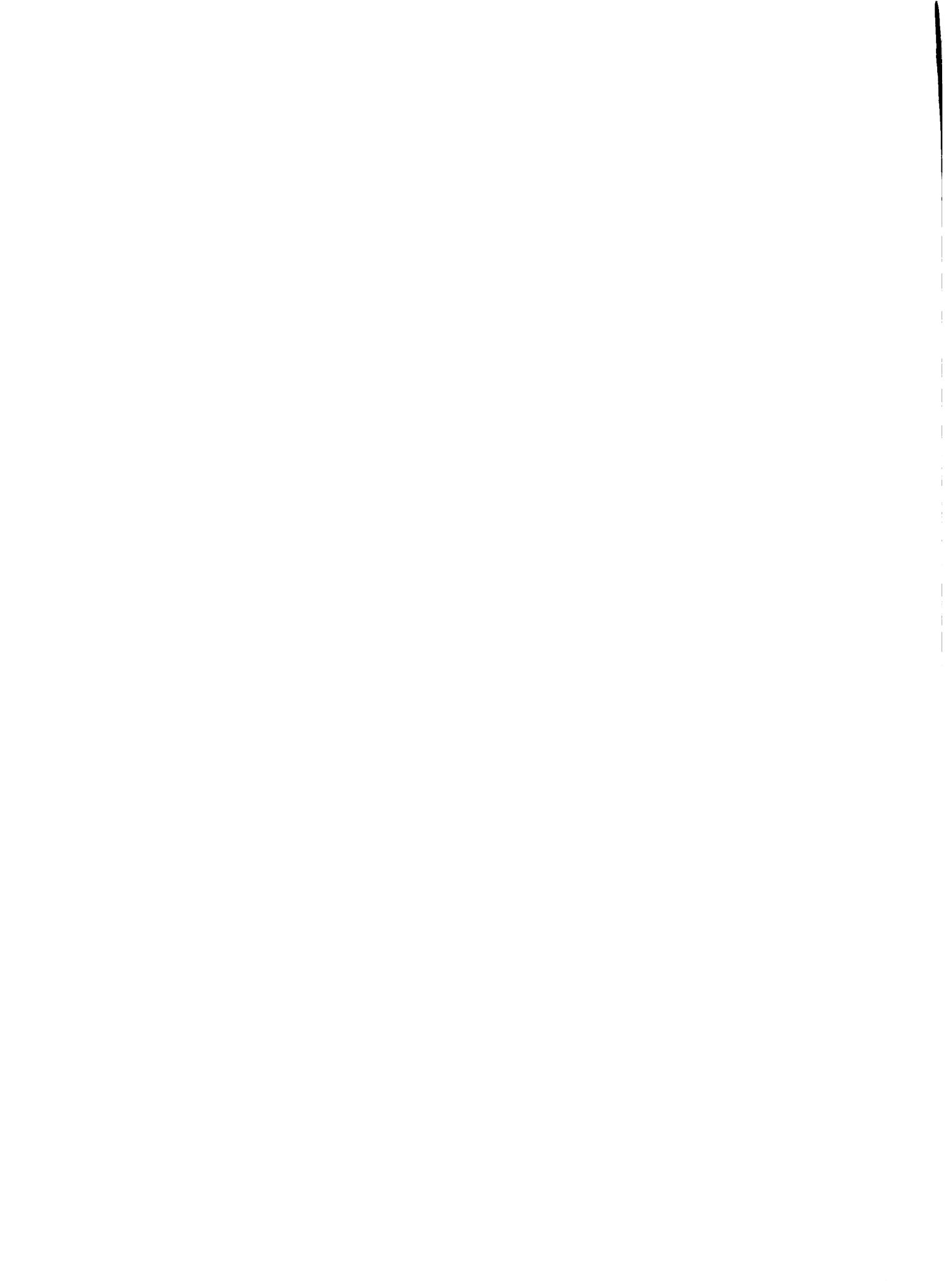
————> ions hypochlorites

Germicides du genre : hypochlorite de sodium, hypochlorite de calcium, acide ou trichloroisocyanurique.

La présence de matériel organique réduit l'efficacité du chlore -
Efficace pour les cellules végétatives.

L'iode est efficace pour détruire le bacille tuberculeux. Son action dépend de la libération de l'iode.

d) Phénol (acide carbolique). Agit sur les formes végétatives. Très



S T E R I L I S A T I O N

1. STERILISATION PAR L'ACTION DE L'AIR CHAUD

a) Chaleur sèche : articles corrosifs par la vapeur

- pipettes emballées dans les cylindres métalliques
- matériels anhydres
- Substances deshydratées

Recommandation :

- 340°F (170°C)..... 1h.
- 320°F (160°C)..... 2h.
- 300°F (150°C)..... 2 1/2 h.
- 285°F (140°C)..... 3 h.
- 250°F (121°C)..... 6 h.

b) Vapeur saturée sous pression (Autoclave)

2. STERILISATION PAR FILTRATION

a) Filtration profonde

b) Filtration à travers le tamis

c) Filtration à travers la membrane

a. plaque asbeste

bougie porcelaine

terre

b. diamètre du pore

c. Diamètre du pore (uniforme)

3. STERILISATION AU MOYEN DE LA RADIATION IONISANTE

4. STERILISATION A L'AIDE DE RADIATION ULTRAVIOLETTE

5. STERILISATION CHIMIQUE

Germicides gazeux et liquides

(Formol, gluteraldéhyde, oxyde d'éthylène.



irritants pour la peau. Les dérivés du phénol possèdent de très bonnes propriétés germicides.

Sont stables et ne sont pas inactivés en présence de matériel organique ou du savon.

e) Alcool. (Ethylique et isopropylique). Action biocide sur les formes végétatives et le Bacille tuberculeux.

Conditions que doit réunir un bon désinfectant

1. Avoir un champ d'action très vaste (efficace en présence des espèces virales, champignons et bactéries).
2. Il doit être stable (emmagasiner ou exposition à températures modérées).
3. Il ne doit pas être affecté par les sels, pH ou dureté de l'eau employée pour la dilution.
4. La matière organique ne doit pas neutraliser son activité.
5. Il ne doit être ni toxique, ni irritant pour la peau ou les tissus.
6. Ne doit pas colorer ou ronger les surfaces et les objets.

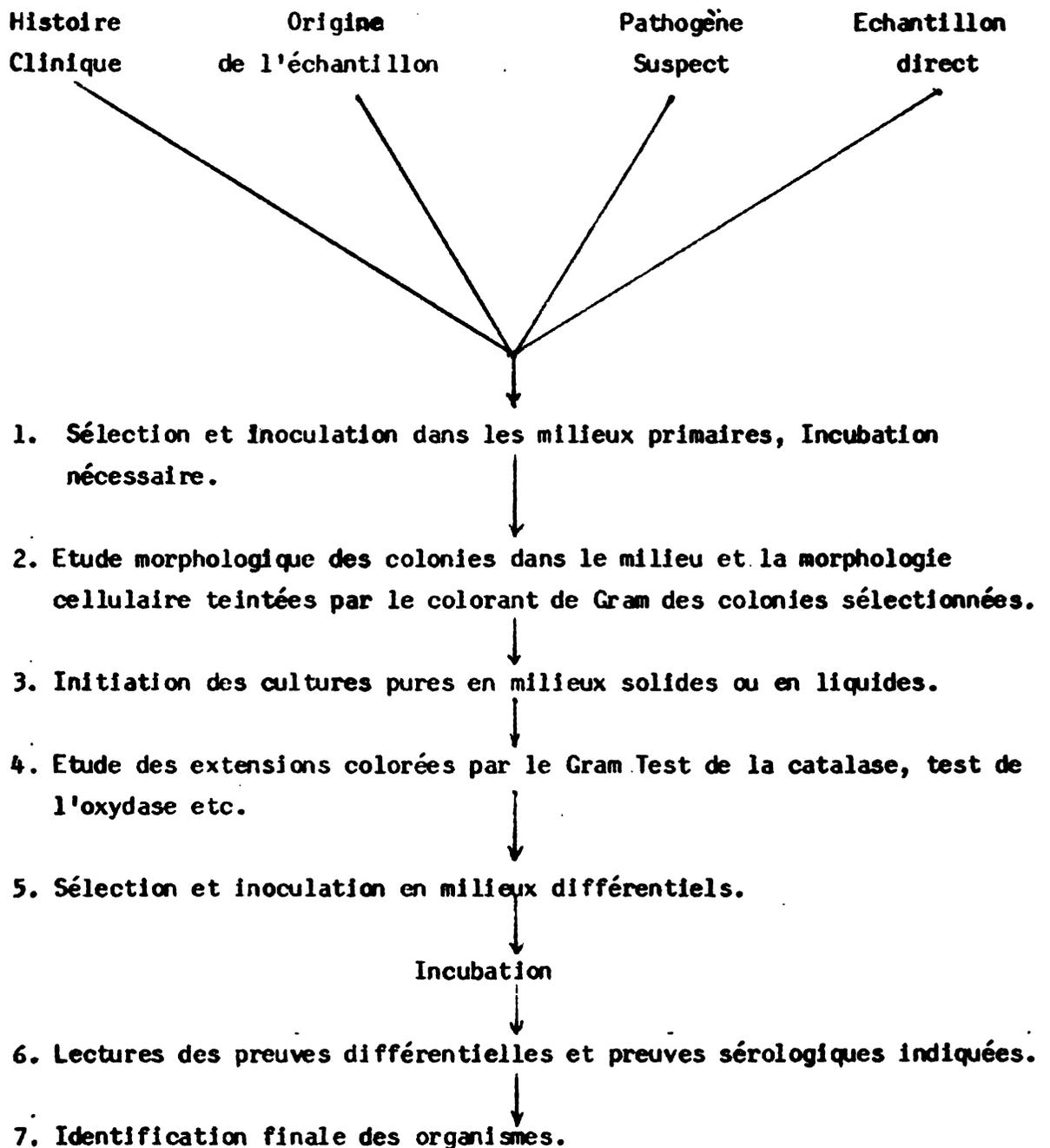


DEUXIEME PARTIE : BACTERIOLOGIE

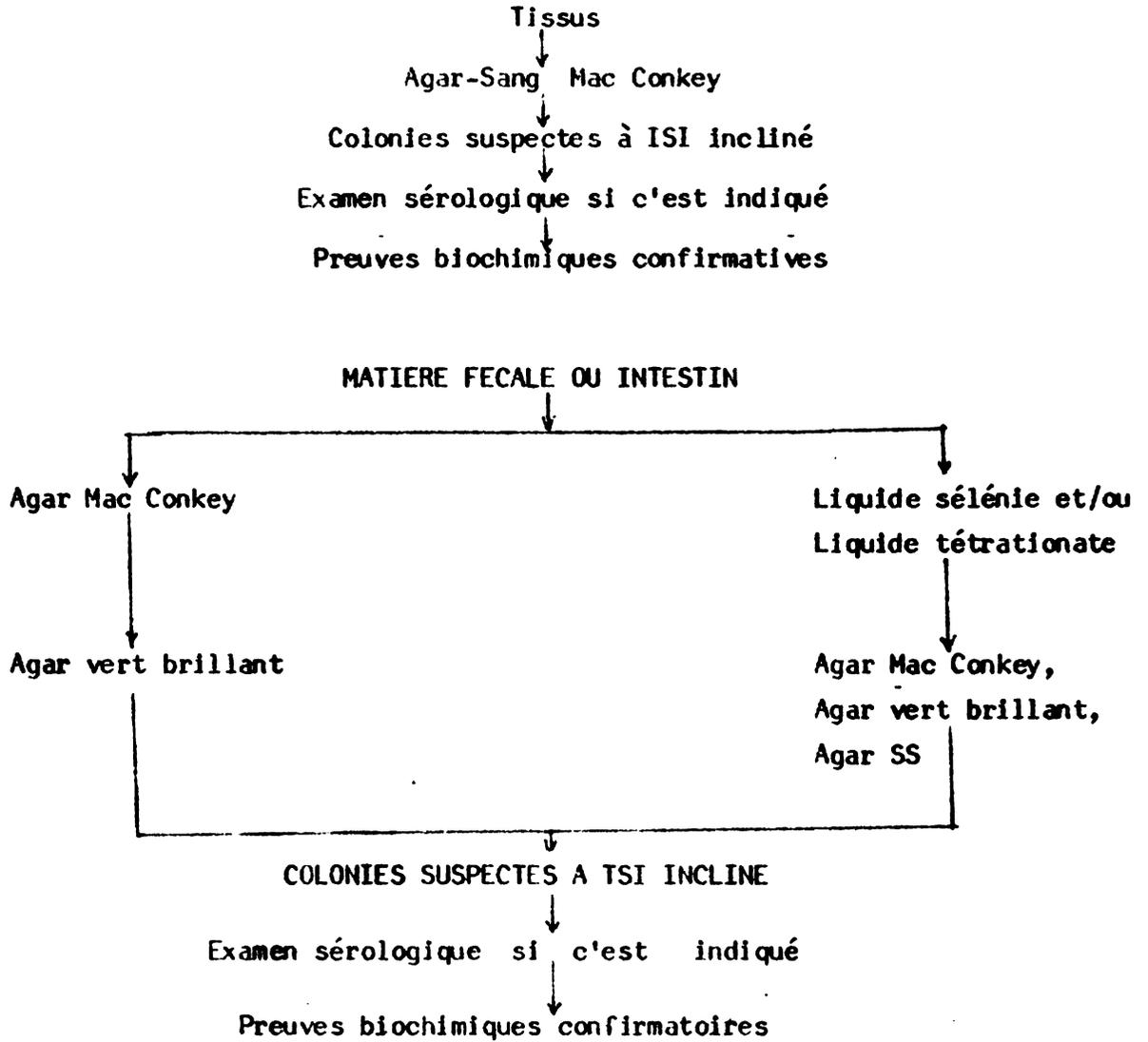
- _ Principaux groupes de bactéries**
- Méthode d'isolement des pasteurellas**
- Méthode d'isolement des Brucellas**
- Méthode d'ioslement des Clostridiums**
- Méthode d'isolement des Campylobacters**
- Genre Brucella**
- Tests d'agglutination pour diagnostiquer la Brucellose**
- Colorations**
- Epreuves différentielles spéciales**

TRAITEMENT DES ECHANTILLONS AU LABORATOIRE

Etapes à suivre pour l'isolement et l'identification
des bactéries des spécimens cliniques



Méthodes pour l'Isolément et l'Identification des Bactéries Entériques.



PRINCIPAUX GROUPE DE BACTERIES

I - Bactéries Gram-Positives

Forme	Mouvements	Autres Caractéristiques	Nature	Famille
Cocci	Presque tous Immobilés	Cellules arrangées cubiques	Sarcina	Mitococcacée
		Cellules arrangées irrégulières	Micrococci Staphylocoques	
Bacilles droits	Presque tous Immobilés	Cellules en chaînes	Streptocoques	Lactobacile
		Fermentation lactée de sucres	Diplocoques	
Plusieurs	Immobilés	Fermentation lactée de sucres	Lactobacilles	Lactobacillacées
		Fermentation propionique de sucre oxydés	Propionibac- térien Coryno- bactérien	Propionibactériacées Corynobacté- riacées
Mobiles avec et formes	Immobilés	Faiblement fermentés	Erysiphéle Listeria	
		Production d'endospores	Bacilles	
Immobilés en relation		Anaérobiques	Clostridium	Bacillacées

II - BACTERIES GRAM-NEGATIVES

Cocci	Formes mobiles	Sérologiques	Neisseria	Neissériacée	
		Anaérobiques	Veillonella		
Bacilles droits	Mobiles avec plusieurs flagelles et formes immobiles en relation	Anaérobiques facultatifs	Fermentation acides des sucres	Escherichia Erwinia Shigella Salmonella Proteus	Entero-Bactériacée
			Fermentation des sucres buthylène-glycol	Enterobac-Serratia	
		Aérobiques	Fixateurs libres de Nitrogène	Azobacter	Azobacte-
		Fixateurs Symbiotiques de Nitrogène	Rhizobium	Rhizobiacée	
		Aérobiques	Oxydation de composés inorganiques Oxydation de composés organiques	Nitrosomonas Nitrobacter Thiobacilles Pseudo-Acetobacter	Nitrobactériacée Thiobactériacée Pseudomonadacée
		Anaérobiques Facultatifs		Photobacterium Zymomonas Aeromonas	
Bacilles Courbes	Mobiles avec flagelles	Spirales en forme de virgule	Aérobiques Anaérobique	Vibrion Spirillacée Desulfovibrion Spirille	

III. AUTRES GROUPES IMPORTANTS

Caractéristiques	Genres	Ordre (ètes) ou Familles (acée)
Bacilles acido-résistants	Mycobactérium	Actinomycètes
Bacilles en disposition linéaire (Actinomycètes)	Actinomycès Nocardia Streptomycès	
Organismes spiraux mobiles	Tréponéma Borrelia Leptospira Spirochètes	Spirochètes
Petits pléomorphiques Ils n'ont pas de paroi rigide	Mycoplasma	Mycoplasmatacée
Parasites petits intracellulaires	Rickettsia Coxiella	Rickettsiacée
Parasites petits intracellulaires filtrables	Chlamydia	Chlamidiacée
Parasites intracellulaires Limite avec les Protozoaires	Bartonella	Bartonellacée

Méthode d'isolement des Brucellas

Matériels Cliniques

(Placenta, foetus,)

Ecouvillonnage du
tractus génital

Agar Sang

Agar Brucella

Agar triptose

(37°C dans 10% CO₂)

Inoculation aux cobayes

(voie S.C.)

24 jours = agglutination

A 8 semaines

Nécropsie

Lésions

Epreuves différentielles

Mobilité

Catalase

Uréase

Oxydase

Réduction de Nitrates

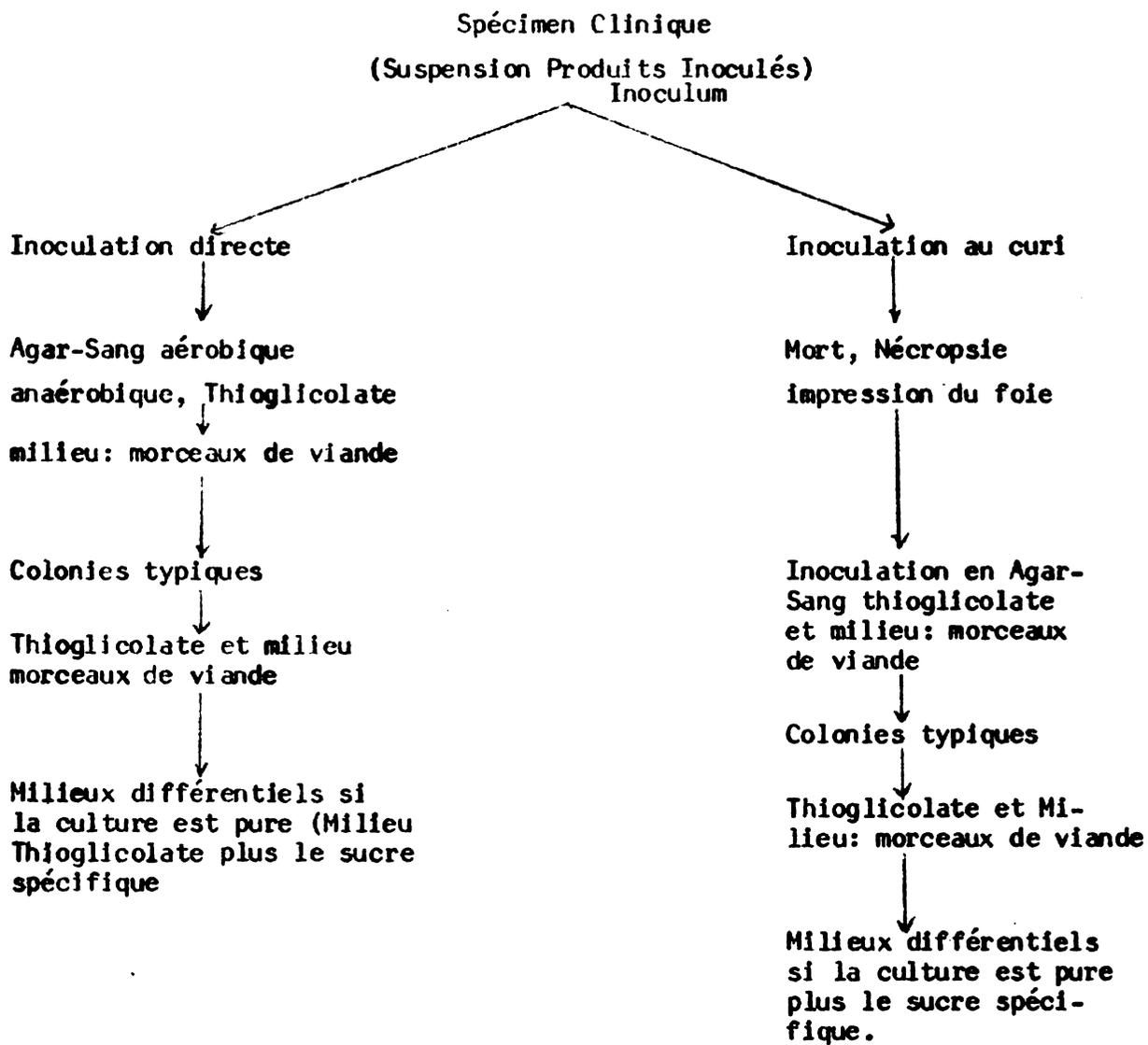
MR - VP négatif

Indol

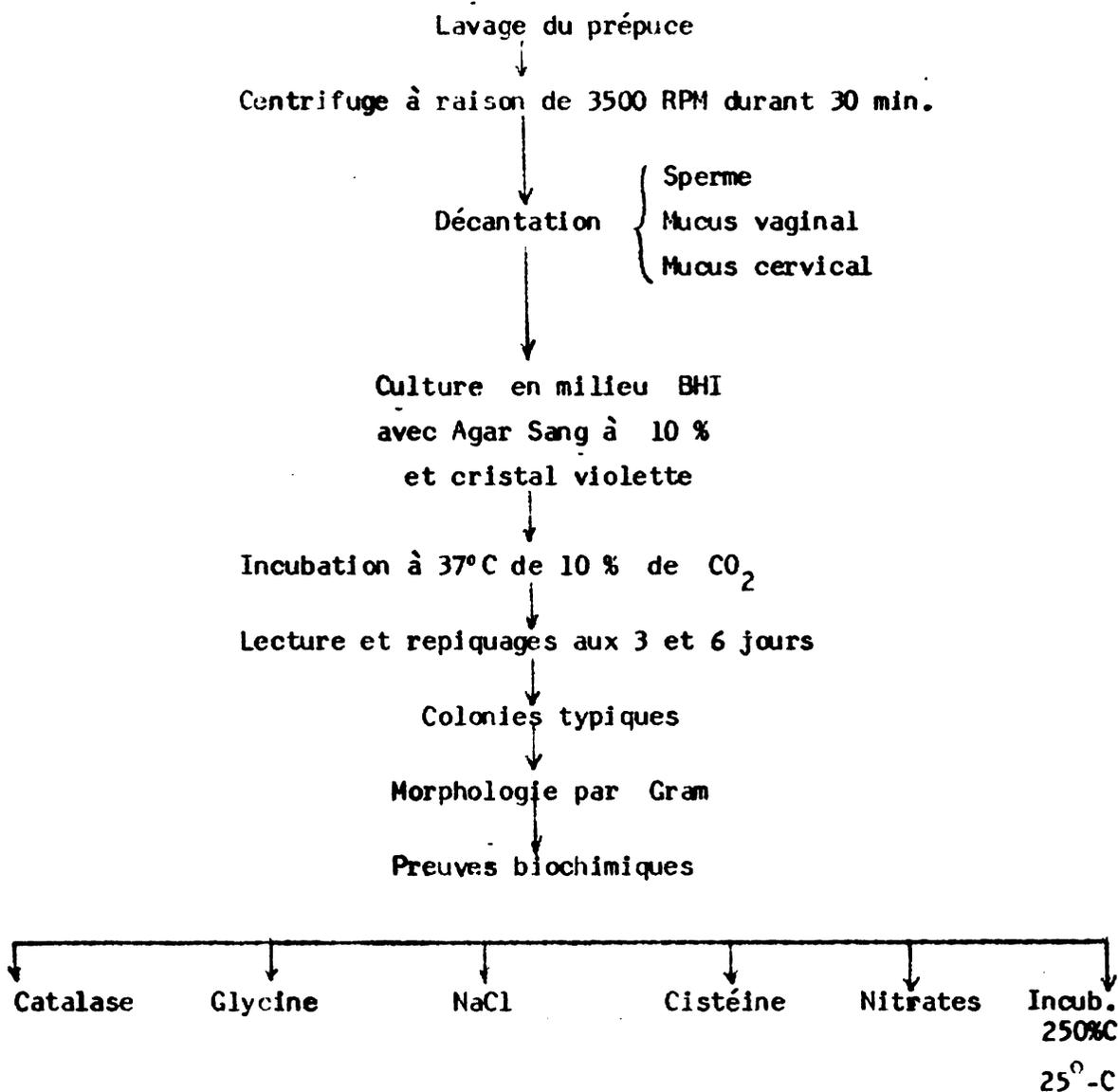
Gélatine

Fuchsine et Thionine

Méthode pour l'isolement des clostridiums



Traitement d'échantillons pour l'isolement du campylobacter sp.



Classification du Microorganisme

GENRE BRUCELLA

Ce sont des bacilles courts ou coccibacilles isolés ou en chaînes courtes; Ils sont immobiles et ne forment pas des endospores, Gram négatifs et ne montrent pas de coloration bipolaire.

Métabolisme respiratoire. A besoin des vitamines pour leur croissance:
Thianine, niacine, biotine

Catalase positive. Oxydase généralement positive (sauf *B. neotomae*, *B. ovis*).

- N'hydrolysent pas l'urée.
- N'utilisent pas le citrate. Indol. négatif.
- Rouge méthyle et Voges Proskaner négatifs - lait chatoyant ne change pas.
- Aérobic stricte, certaines ont besoin de 5 - 10 % de CO₂ spécialement dans les isolements initiaux.
- Température optimale 37°C. Il peut croître entre 20 et 40°C, pH 6,6 , 7,4.
- Parasites et pathogènes de mammifères facultativement intracellulaire.

Le contenu de G + C du DNA varie entre 56 et 58 moles % (densité fluctuante). Les caractères différentiels des espèces et les biotypes du genre *Brucella* apparaissent dans la table 13.

TABLE 13: Caractéristiques différentielles des espèces et biotypes du Genre Brucella.

Biotype	CO ₂ Condition Nécessaire	H ₂ S Produit	Croissance dans un milieu avec colorant		
			Fuchsine basique		Thionine
			b	a	b
1. B. Melitensis I					
	-	-	+	-	+
2	-	-	+	-	+
3	-	-	+	-	+
2. B. abortus					
1	d	+	+	-	-
2	d	+	-	-	-
3	d	+	+	+	+
4	d	+	+	-	-
5	-	-	+	-	+
6	-	-	+	-	+
7	-	d	+	-	+
8	+	-	+	-	+
9	-	+	+	-	+
3. B. suis					
1	-	+	-	+	+
2	-	-	-	-	+
3	-	-	+	+	+
4	-	-	+	+	+

4. *B. néotomae*

- + - - +

5. *B. ovis*

- - - + +

6. *B. canis*

- - - + +

Test d'Agglutination pour le Brucella

Le patron employé suit les normes de la FAO, de l'OMS et de l'OTE dans le but de contribuer à l'uniformité de la technique et de son interprétation. Les antigènes se préparent suivant la technique standard.

Procédé pour la preuve sur plaque

L'antigène s'est adapté à une technique définie n'importe quelle déviation donnera des résultats inexacts.

Le matériel nécessaire pour cette preuve comprend:

- Pipettes de bang de 0,2 ml
- Caisse de lecture avec plaque de verre
- compte-gouttes d'antigène de 0,03 ml par goutte
- mélangeurs.

Avec la pipette pour la sérologie exacte soutenue dans une position oblique de 45° et touchant la plaque de verre, on dépose 0,08 - 0,04 - 0,02 et 0,01 ml de sérum dans quatre cellules d'une même rangée de la plaque

On agite doucement l'antigène et avec le compte-gouttes en position verticale on laisse tomber une goutte d'antigène (0,03 ml) dans chaque cellule quadrillée avec du sérum. De cette manière, les dilutions du sérum correspondent à 1/25 à 1/50 et à 1/100 et à 1/200 respectivement.

On commence par la cellule qui contient 0,01 ml de sérum, on mélange bien le sérum et l'antigène en faisant des mouvements circulaires qui couvrent

les zones suivantes :

1/25 = 27 mm de diamètre

1/50 = 24 mm de diamètre

1/100 = 21 mm de diamètre

1/200 = 18 mm de diamètre

On remue doucement la plaque de manière rotatoire, les réactions ainsi préparées dans l'agglutinoscope s'incubent sans lumière et couvertes d'un couvercle de verre, durant 8 minutes. Trois minutes avant la lecture on donne un léger mouvement de rotation. A 8 minutes près, on réalise la lecture avec la lumière et sur fond obscur en inclinant légèrement la plaque. On fait 3 classifications :

- Agglutination complète (+)
- Agglutination incomplète (I)
- Agglutination négative (-).

Méthode pour réaliser le test du tube

A l'aide d'une pipette graduée, on dépose les quantités de 0,08, 0,04, 0,02 et 0,01 ml de sérum dans chacun des 4 tubes d'agglutination. La base du menisque dans l'orifice de la pipette doit toucher la ligne de graduation requise. La pipette s'insère dans le fond du tube et on la retire en appuyant sur les parois pour permettre que soit déposé le sérum détenu dans la pointe de la pipette.

On distribue après 2 ml d'antigène (0,045 % de Brucellas) dans chacun des tubes contenant du sérum afin d'obtenir des dilutions de 1/25 de 1/50, de 1/100 et de 1/200 respectivement. Agitez doucement et incubez à 37°C durant 40 à 46 heures.

La lecture doit se faire sur un fond noir opaque, avec lumière puissante capable de traverser les tubes.

L'agglutination de l'antigène sous forme de grumeaux et de sédiment au fond du tube à cause de la gravité, détermine la clarification du liquide.

L'agglutination est complète (+) quand le liquide du mélange sérum-antigène apparaît clair et que la simple agitation ne rompt pas les grumeaux.

L'agglutination est incomplète (I) quand le mélange sérum-antigène est partiellement clair et que la simple agitation ne rompt pas les grumeaux.

L'agglutination est négative (-) quand le mélange sérum-antigène n'apparaît pas clair et que la simple agitation ne révèle pas de grumeaux.

Interprétation des résultats

Dans les tableaux suivants on donne les interprétations des résultats de la séroagglutination pour la méthode du tube et pour le test rapide. C'est une adaptation du 4ème. rapport du comité FAO, OMS d'experts en Brucellose.

Bovins non vaccinés ou vaccinés à un âge supérieur à 8 mois

1/25 = 25 UI	1/50 = 50 UI	1/100 = 100 UI	1/200 = 200 UI	Interp.
-	-	-	-	Nég.
I	-	-	-	Nég.
+	-	-	-	Nég.
+	I	-	-	Suspect
+	+	-	-	Suspect
+	+	I	-	Suspect
+	+	+	-	Pos.
+	+	+	I	Pos.
+	+	+	+	Pos.

Bovins de 30 mois ou plus, vaccinés à l'âge de 4 à 8 mois

1/25 = 25 UI	1/50 = 50 UI	1/100 = 100 UI	1/200 = 200 UI	Interp.
-	-	-	-	Nég.
I	-	-	-	Nég.
+	-	-	-	Nég.
+	+	-	-	Nég.
+	+	I	-	Suspect
+	+	+	-	Suspect
+	+	+	I	Suspect
+	+	+	+	Positif

COLORATION PAR LE GRAM

C'est le danois Hans CHRISTIAN GRAM qui découvrit en 1884 cette méthode de coloration. Beaucoup de modifications ont été faites au cours de ces dernières années, cependant les notions de base persistent encore.

La modification de HUCKER est facile à utiliser à cause de sa rapidité et son effectivité.

REACTIFS

a. Solution "Mère" de cristal violette

Cristal violette	85 %	20 gr
Ethanol	95 %	100 ml

b. Solution "Mère" d'Oxalate

Oxalate d'Ammonium		1 gr
Eau distillée		100 ml

Solution à employer : Diluez la solution mère de cristal violette 1:10 avec de l'eau distillée et ensuite mélangez avec 4 volumes de la solution mère d'oxalate. Gardez dans un flacon ayant un couvercle en verre.

c. Solution Lugol iodurée pour GRAM

Cristaux d'iode		1 gr
Iodure de Potassium		2 gr

Faites dissoudre complètement dans 5 ml d'eau distillée, ensuite ajoutez :

- Eau distillée	240 ml
- Bicarbonate de Sodium à 5 % (solution aqueuse)	60 ml

Mélangez bien et gardez dans des flacons ambrés.

d. Décolorant

Ethanol (95 %)	250 ml
Acétone	250 ml

Mélangez et gardez dans des flacons ayant des couvercles en verre.

e. Colorant de Contraste

Solution "Mère" de safranine

Safranine O	25 gr
Ethanol 95 %	100 ml

Solution à employer: Diluez la solution mère de safranine dans l'eau distillée et dans la proportion 1:5 ou 1:10; gardez en flacon de couvercle en verre.

PROCEDE

1. Agrégez la solution de cristal violette. Laissez-la agir pendant 10 à 20 secondes.

2. Lavez premièrement avec de l'eau et le reste avec le lugol
3. Agrégez le lugol et laissez-le agir durant 10 à 20 secondes
4. Lavez et agitez la lame pour éliminer l'excès d'eau.
5. Décolorez avec la solution d'alcool acétone jusqu'à ce que la lame reste incolore.
6. Ajoutez la solution de safranine et laissez-le agir pendant 10 à 20 secondes.
7. Lavez et laissez sécher.

La coloration de Gram divise toutes les bactéries en deux catégories connues sous les noms de "Gram Positives" et "Gram Négatives" dépendant de que l'organisme résiste ou non à la décoloration par l'acétone, l'alcool ou l'huile d'aniline après le traitement avec un colorant dérivé de la pararosaniline (Ex: Violette de Méthyle) et un traitement subséquent avec la solution iodée.

Les bactéries Gram Positives résistent à la décoloration et restent colorées en violet.

Les bactéries Gram négatives sont décolorées et par conséquent retiennent le colorant de contraste (Fuchsine basique, safranine, rouge neutre et carbol fuchsine diluée). La coloration de Gram est la plus employée au laboratoire, mais en plus de servir pour observer la morphologie des organismes, oriente vers la classification postérieure de l'organisme.

On doit faire ressortir que les espèces qui caractéristiquement sont Gram positives peuvent apparaître Gram négatives sous certaines conditions de croissance surtout dans les anciennes cultures. D'autre part, les espèces qui caractéristiquement sont Gram négatives ne produisent pas de cellules qui se colorent Gram positivement quand la coloration s'effectue de manière correcte.

La réaction de Gram paraît refléter un aspect fondamental de la structure cellulaire et est en relation avec beaucoup d'autres propriétés biologiques, par exemple les différentes espèces d'un genre ont la même réaction les bactéries Gram positives sont plus susceptibles que les Gram négatives à l'action antibactérienne de la pénicilline, aux acides, aux iodures, aux colorants basiques et aux détergents; et moins susceptibles aux alcalis, à l'azida, à l'acide tellurique, aux enzymes protéolytiques etc.

B - COLORATION ACIDO-RESISTANTE

La coloration acido-résistante s'emploie au laboratoire pour colorer les organismes du genre mycobacterium et certains actinomyces (Nocardia) principalement.

Coloration : Méthode Ziehl-Neelsen

Réactifs :

a. Colorant de Carbol - fuchsine

Fuchsine Basique 0,3 gr

Ethanol (95) 10 ml

Mélangez ceci avec le suivant :

Cristaux de Phénol 5 ml

Eau distillée 95 ml

b. Alcool Acide

Acide Chlorhydrique concentré 3 ml

Ethanol 95 % 97 ml

c. Colorant de contraste:

Bleu de Méthylène 0,3 gr

Eau distillée 100 ml

Procédé :

1. Préparez un frottis d'une épaisseur appropriée, laissez sécher.
2. Placez sur le frottis une bande de papier filtre de dimension beaucoup plus petite que la lame.
3. Agrégez le colorant de Carbol-Fuchsine, chauffez jusqu'à ce que des vapeurs se forment. On ne doit pas laisser que le colorant entre en ébullition, il faut aussi éviter le dessèchement de la lame.

Temps : 5 minutes

4. Permettez que le colorant agisse durant 5 minutes sans chauffer à la fin de la période remuer le papier et lavez avec de l'eau courante.

5. Décolorez avec de l'alcool acide jusqu'à la formation d'une couleur rose ou jusqu'à ce qu'on ne voit plus de colorant (pour frotis de dimension appropriées, cette opération dure à peu près une minute).
6. Lavez avec de l'eau. Agrégez le colorant de contraste et laissez agir pendant 20 ou 30 secondes.
7. Lavez, laissez sécher à l'air libre.

Les bactéries acido-résistantes sont relativement imperméables et résistantes à l'action des colorations simples, mais quand on colore avec un colorant fort comme le Carbol-fuchsine, résistent à la décoloration sub-séquente par acides forts. N'importe quel organisme qui ne soit pas acido-résistant sera décoloré par l'action de l'acide et prendra le colorant de contraste.

EPREUVES DIFFERENTIELLES SPECIALES

Voges-Proskauer

Identification de production de l'acétyméthylcarbinol.

Réactifs

Solution 1: 5 % d'alpha-naphtol dans l'alcool éthylique absolu.

Solution 2: 40 % d'hydroxyde de potasse contenant 0,3 % de créatine.

Méthode

On transfère 1,0 ml d'une culture de 48 h à 37°C d'un bouillon de culture MR-VP à un tube Wasserman et on ajoute 0,6 ml de la solution 1, ensuite 0,2 ml de la solution 2. On agite et on laisse durant 5 à 10 minutes. Une couleur orange brillant se développe et s'étend graduellement dans le bouillon de culture au cas où il se produit de l'actylméthylcarbinol.

Méthode alternative : Ajoutez 5 ml d'une solution à 10 % d'hydroxyde de potassium à 5 ml de culture. Agitez et laissez exposer à l'air. Observez à intervalles de deux, douze et vingt-quatre heures. La réaction est positive quand il apparaît une couleur rougeâtre.

Indol

Réactifs : p-diméthylaminobenzaldéhyde

2 g

Alcool éthylique, 95 %

190 ml

Acide hydrochlorique (conc.)

40 ml

Méthode

On ajoute 1 ml d'éther à 5 ml d'une culture de 48 h. milieux: bouillon nitrate triptique eau peptique ou culture de l'infusion de cœur de bœuf. Agitez. Laissez reposer de sorte que l'éther monte à la partie supérieure du tube. Après, déposez lentement 0,5 ml du réactif sur le côté du tube de telle sorte que se forme un anneau entre le milieu et l'éther. Si l'indol s'est accumulé par l'éther, il se forme un anneau rouge brillant sous la couche d'éther. S'il n'y a pas d'indol, aucune couleur n'apparaîtra.

Oxydase

Identification de production de cytochromeoxydase. Préparez une solution à 1 % (0,1 g en 10 ml d'eau distillée) de p-aminodimethylaniline monohydrochlorure ou 0,5 % de N, N, N', N' - tetramethyl - p - plenyldiamine dihydrochlorure.

Le colorant est ajouté à l'eau distillée en laissant reposer le tube pendant 15 minutes avant son usage. La solution doit être conservée dans un flacon ambré sous réfrigération. Les solutions du premier composé sont satisfaisante pour une semaine approximativement, tandis que les solutions du second composé peuvent être utilisés pour un mois.

Méthodes

On ajoute la solution de colorant aux portions de culture qui contiennent les colonies suspectes. Les colonies qui contiennent citocroooxydases deviennent rosées, changeant au rouge, et finalement au noir quand on utilise les solutions du premier composé. Les solutions de l'autre composé colorent les colonies positives à citocroooxydase en rouge foncé. On peut obtenir commercialement les bandes de papier ou les disques qui contiennent du p-aminodiméthylaniline.

CATALASE

On utilise les cultures en tube incliné. On ajoute 1 ml d'une solution à 3 % de peroxyde d'hydrogène sur la culture. On agite le tube de manière que la solution couvre la surface de croissance. Une ébullition rapide de gaz indique une réaction positive.

Le test peut être aussi fait en transférant une petite quantité de culture, de préférence une colonie à une lamelle porte-objet. On ajoute une goutte de peroxyde d'hydrogène frais (3 %) en appliquant ensuite un couvre-objet. Réaction positive : production de bulles de gaz.

ROUGE DE METHYL

Réactifs :

La solution de rouge de méthyl se prépare en dissolvant 0,1g de rouge de méthyl dans 300 ml d'alcool éthylique à 95 % en le diluant à 500 ml avec de l'eau distillée.



Méthode

Avec 5 ml de culture (incubé pendant 5 jours à 37°C dans un bouillon de liquide MR - VP), ajouter 5 gouttes de solution de rouge de méthyl. Une réaction positive se manifeste par une couleur rouge claire, indiquant l'acidification (pH 4,4 - 6,0). Une couleur jaune constitue une réaction négative.

REDUCTION DE NITRATES

Réactifs

Solution 1 : Alphanaphthylamine

5 N acide acétique (q. s. p. 1.041 g) 1.000 ml 5g. Filtrer
Filtrer à travers du coton absorbant.

Solution 2 : Acide sulfanilique

Acide acétique 5 N (a. s. p. 1.041 g) 1000 ml 8g.

Méthode

Ajouter à 5 ml de culture en bouillon de liquide nitrate 1 ml de solution 2 suivi de 1 ml de solution 1 ajoutée goutte à goutte. En présence de nitrites, se développe une couleur rosée, rouge ou marron.

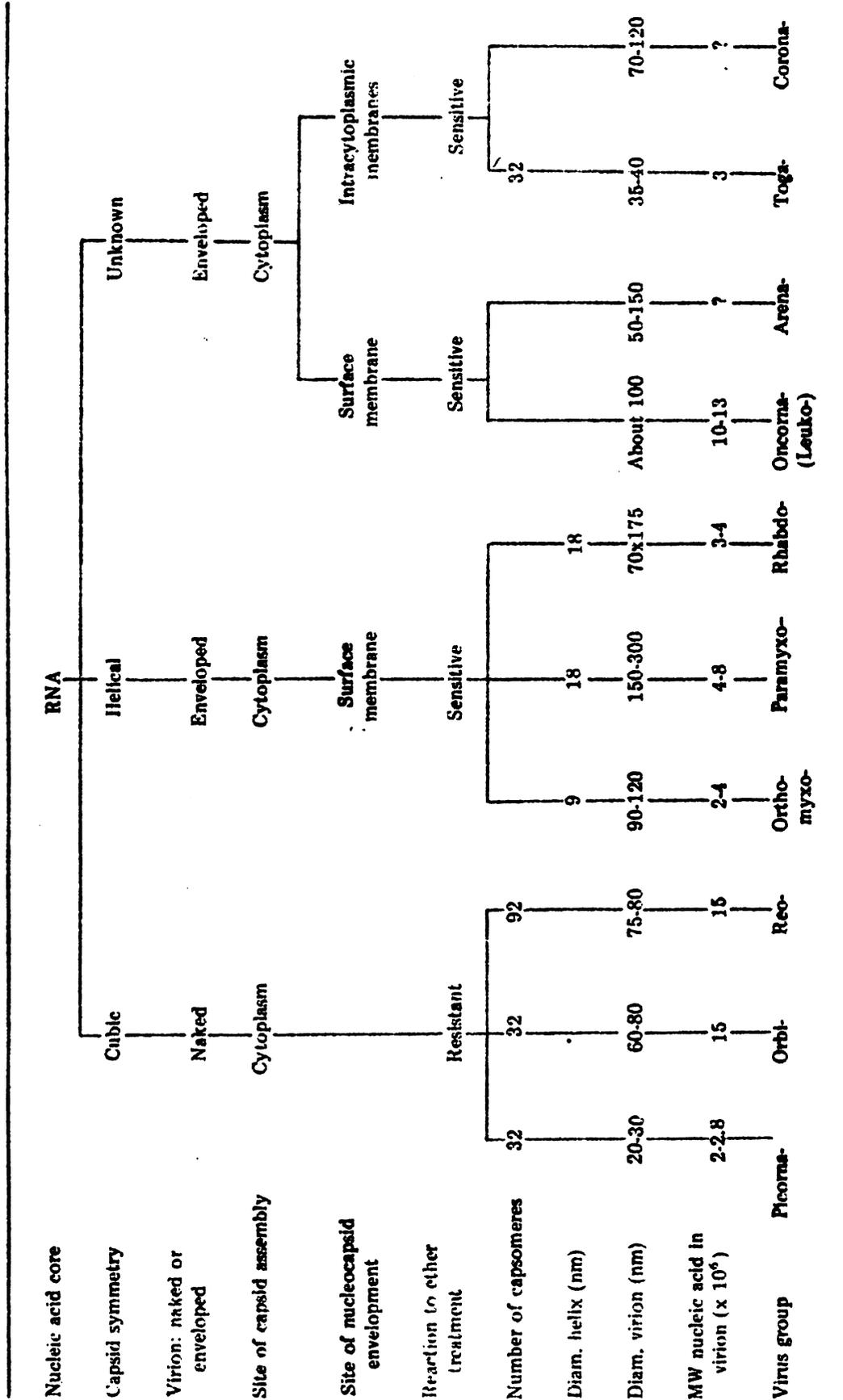
Dans le test de réduction de nitrates, s'il est négatif, le nitrate n'a pas été désagrégé ou le nitrite a été désagrégé au préalable. La présence ou l'absence de nitrates peut être déterminé en ajoutant une petite quantité de poudre de zinc. La quantité est critique de telle sorte que

la même quantité de zinc doit être ajoutée à un tube contrôle non inoculé. En présence de nitrates, on obtient une couleur rouge comme résultat de la réduction du nitrate par le zinc. Si le test de zinc n'indique pas la présence de nitrates et le test de nitrites est positif, le nitrite a été désagrégé par la suite et l'organisme que l'on considère, produira une réaction positive de réduction de nitrates.

TROISIEME PARTIE : VIROLOGIE

- Clasification des virus animaux
- Isolation des virus
- Inoculation des oeufs embrionés
- Technique de l'Immunodifusion
- Technique d'hémagglutination et d'inhibition d'hémagglutination
- Immunofluorescence
- Immunoélectrosmophorèse (IEOP)
- Enzime - immuno - essai (ELISA)

Table 25. Current classification of animal RNA viruses



(Adapted from Melnick, J. L. (1972). Classification and Nomenclature of Viruses, 1972. Progress in Medical Virology 14, 321. S. Karger, New York.)

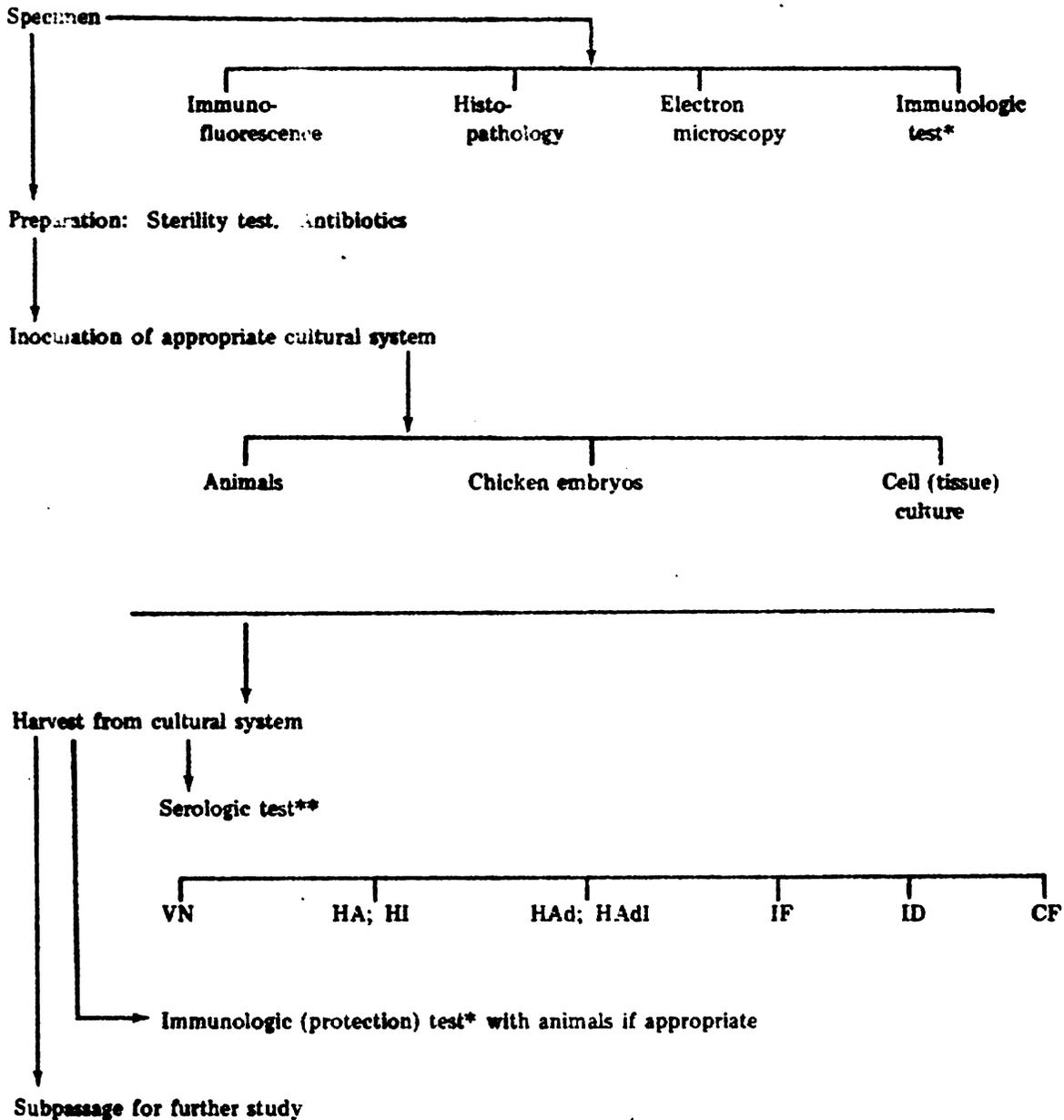


Table 24. Current classification of animal DNA viruses

Nucleic acid core	DNA	
Capsid symmetry	Cubic	Complex
Virion: naked or enveloped	Naked	Enveloped
Site of capsid assembly	Nucleus	Nucleus
Site of nucleocapsid envelopment		Nuclear membrane
Reaction to ether treatment	Resistant	Sensitive
No. capsomeres	32	162
Diam. helix (nm)	72	100
Diam. virion (nm)	43-53	230 x 300
MW nucleic acid in virion (x 10 ⁶)	1.4	160
Virus group	Parvo- (Picorna-)	Pox-
	Papova-	Herpes-
	Adeno-	

(Adapted from Melnick, J. L. (1972). Classification and Nomenclature of Viruses, 1972. Progress in Medical Virology 14. 321 S. Karger New York.)

Table 4. General outline for isolation and identification of human and animal viruses



**VN - virus neutralization
HA - hemagglutination;
HAd - hemadsorption;
IF - immunofluorescence
ID - immunodiffusion
CF - complement-fixation

HI - hemagglutination-inhibition
HAdI - hemadsorption-inhibition

Table 5. Specimens to be collected for isolation of some human and animal viruses

Infection	Source of Specimen	
	Clinical	Necropsy
Respiratory		
Influenzas	Nasal swabs, mucus	Lung
Parainfluenzas	"	"
Newcastle disease	"	"
Rhinoviruses	Nasal and conjunctival swabs, mucus	"
Avian laryngotracheitis	Nasal swabs, mucus	Trachea
Avian, human coronaviruses	"	Lung
Canine distemper	Nasal and conjunctival swabs, mucus	Intestine, bladder
Central nervous system		
Arboviruses	Blood, cerebrospinal fluid	Brain
Rabies	Saliva	Brain
Coxsackie	Feces, cerebrospinal fluid	Brain
Enteric		
Poliomyelitis	Feces	Brain
Animal enteroviruses	"	Intestine
Cutaneous and mucous membranes		
Poxes	Vesicular fluid	---
Vesicular stomatitis	"	Mucous membrane
Herpes simplex, zoster	"	---

ROUTES OF INOCULATION OF CHICKEN EMBRYOS

Allantoic Cavity

METHOD 1—Figure 2-A

1. Candle the egg and select an area of the chorioallantoic membrane distant from the embryo and amnionic cavity and free of large blood vessels about 3 mm below the base of the air cell. In this area make a pencil mark at the point for inoculation.
2. Make a similar mark at the upper extremity of the shell over the air cell.
3. Drill a small hole *through the shell* at each mark but *do not pierce the shell membrane*.
4. Apply tincture of metaphen or another suitable disinfectant to the holes and allow to dry.

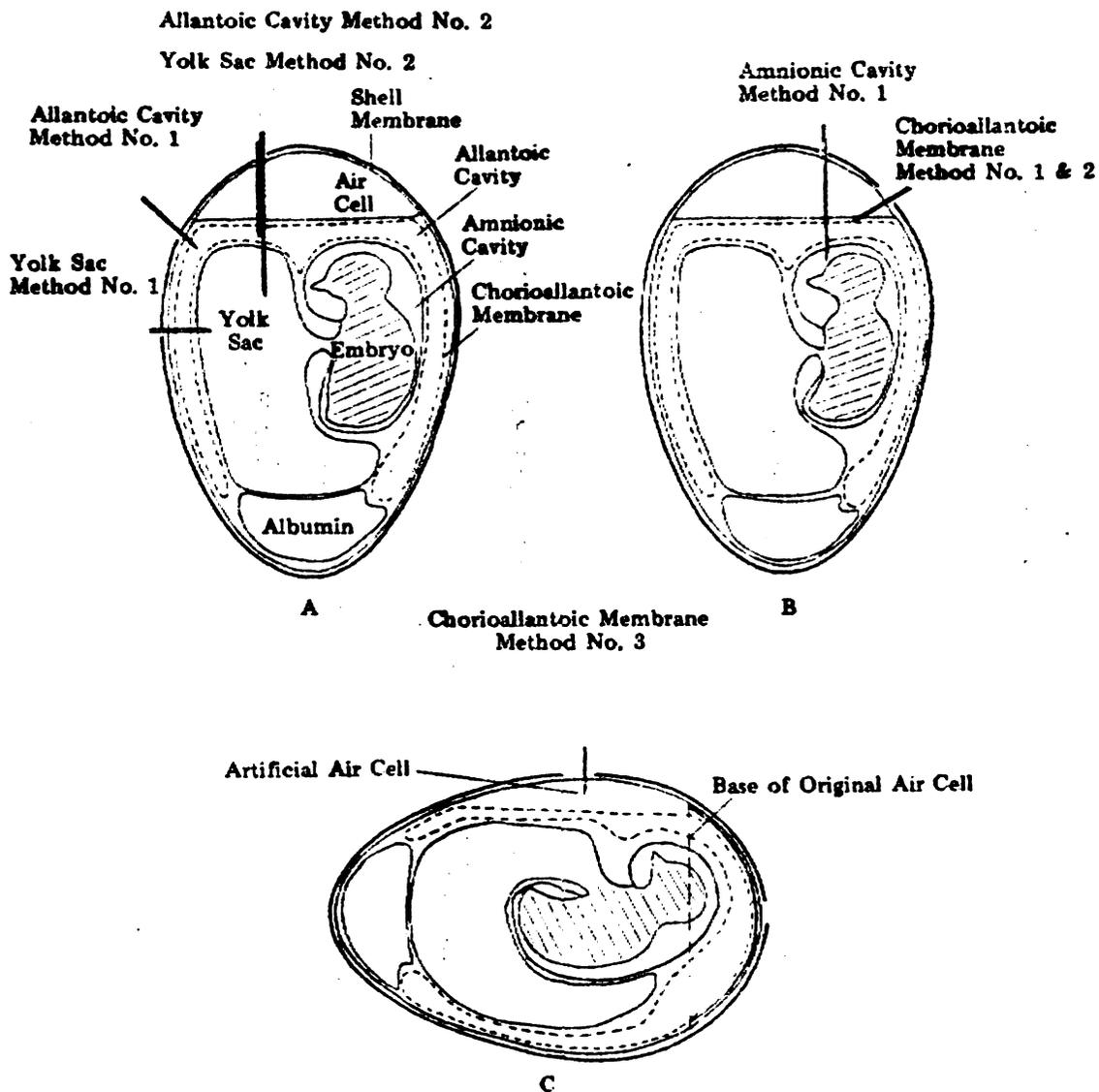


Figure 2. Routes of inoculation of chicken embryos.

TECHNIQUE DE L'IMMUNODIFFUSION

L'immunodiffusion est une technique de grande utilité, non seulement pour le diagnostic de quelques maladies virales mais encore pour les études de caractères des antigènes de divers microorganismes. A travers son usage, on voit une réaction de précipitation dans un milieu semi-solide. Les réactifs, antigènes et anticorps s'attirent et se précipitent dans la zone où les proportions sont excellentes. Le précipité s'exprime à la manière d'une ou plusieurs lignes blanches ou opalescentes qui restent stables.

On utilise divers agents gélifiants mais l'Agar est le plus communément utilisé pour les virus animaux.

Il existe différents types d'immunodiffusion, mais la meilleure application est celle de la double diffusion de Ouchterlony. L'immuno-électrophorèse, une méthode analytique très sensible, combine la diffusion de l'agar avec la migration électrophorétique des réactifs. A cette catégorie appartient la technique d'immunoélectroosmophorèse de grande utilité en études pour déterminer les réactions sérologiques du virus de la peste porcine africaine. La immunodiffusion radiale de Mancini, permet une quantification exacte d'antigènes, anticorps et du complexe formé.

1. Matériels (Diagnostic d'Anémie Infectueuse Equine)

Agar noble spécial (Laboratoire Difco)

Buffler borate PH 8,6

Pipettes Pasteur

Boîtes de pétri de 100 mm de diamètre

Perforateur pour l'agar

Antigène spécifique

Anti-sérum contrôle positif

2. Méthodes

- a. Préparez les solutions de 1 à 2 % d'agar en buffer borate PH 8,6.
L'agar, dans un milieu de chauffage approprié (ébullition ou autoclave à 100°C durant 5 minutes) présente des granulés non dissouts, doit être éliminé.
- b. Placez 5 ml d'agar à 2 % dans chaque boîte de pétri et laissez gélifier.
- c. Placez une couche d'agar à 1 %, 15 ml, sur la partie antérieure et laissez refroidir afin de permettre l'évacuation de la vapeur.
- d. Elaborez les cellules dans l'agar, utilisant un moule de sept orifices, un central et six périphériques de 7 mm de diamètre et avec une distance de 3 mm entre eux. Coupez la couche superficielle d'agar seulement.
- e. Succion de l'excès d'agar
- f. Placez quelques gouttes d'antigène dans la cellule centrale, en ayant soin de ne pas les remplir excessivement.
- g. Placez le sérum contrôle positif de chaque côté du sérum à mettre à l'épreuve. Placez les sérums diagnostiqués. On peut diagnostiquer un total de 3 échantillons dans chaque moule.
- h. Placez les boîtes à la température ambiante en chambre humide.
- i. Observez entre 48 et 72 heures pour détecter la formation de lignes spécifiques. Utilisez la lumière indirecte forte et fond obscur pour visualiser.

- j. Reportez vos résultats, élaborer quelques schémas, analysez et formulez des recommandations concernant chacun d'eux.

TECHNIQUE DE L'HEMAGGLUTINATION

Certains virus ou leurs antigènes s'adsorbent aux globules rouges ou érythrocytes, à partir de récepteurs dans leur superficie. Comme résultat, les globules rouges s'agglutinent, phénomène appelé HEMAGGLUTINATION

Le test d'HEMAGGLUTINATION est très simple. Fondamentalement, les érythrocytes en suspension sont en contact avec :

- 1) une suspension qui contient les virus (ou ses antigènes) ou
- 2) une préparation sans virus ou ses antigènes.

Les érythrocytes se déposent par gravité :

- 1) en présence du virus (ou ses antigènes) ensemble, ou en absence de virus comme un disque compact dans le fond du tube.

Cette preuve s'utilise amplement pour le diagnostic de quelques infections virales de l'homme ou des animaux. En général, aux fins d'avoir certains diagnostics, on emploie les érythrocytes des poulets ou des humains du groupe sanguin 0. Dans le diagnostic courant, (virus d'influenza ou new-castle) on utilise virus inactifs pour diminuer le risque des infections humaines.

1. Matériels

Suspension de virus (Virus de newcastle)

Erythrocytes citratés

NaCl (0,85 %) ou PBS (0,01 M, pH 7,2)

Tubes de centrifuge

Tubes de sérologie, 12 x 72 mm, de fond circulaire

Pipettes stériles de 1,0 et 10.0 ml.

Centrifuge

Bain marie, 37° C

Calibre (Éliminez le dernier lavage).

2. Méthodes

- a. Séparez le plasma des globules rouges en centrifugeant les cellules citratées. Dans la saignée, utilisez une partie de citrate de sodium à 5 % pour 5 parties de sang. Lavez trois fois les cellules dans la saline à 0,85 % : mélangez la suspension citratée avec 5 volumes de saline approximativement, laissez déposer la suspension à 1500 RPM pour dix minutes. Éliminez le superflu, agrégez la saline fraîche et répétez deux fois de plus*. Suspendre à nouveau le résidu en saline à 10 %. Gardez à la température de réfrigération (4°C) pour 5 à 6 jours.
- b. Préparez une suspension d'érythrocytes en PBS de 0,5 %.
- c. Préparez les dilutions doubles en série (1:10 à 1:640) de la suspension virale en PBS.

Dilutions

	1:10	1:20	1:80	1:160	1:320	1:640	CONT
PBS (ml)	3.6	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Virus (ml) 0.4		0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.0
						↓ à éliminer	

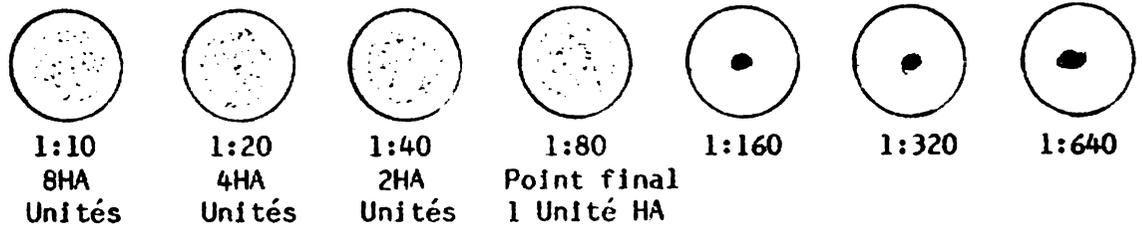
- d. Agrégez 0,4 ml d'érythrocytes à 0,5 % à tous les tubes (les tubes contrôles doivent tenir 0,4 ml de PBS plus 0.4 ml d'érythrocytes).
- e. Agitez les tubes. Placez les au bain marie, à intervalles de 15, 30, 45 et 60 minutes. Lisez la réaction en examinant l'aspect des érythrocytes accumulés au fond du tube, regardant comme dans un miroir

placé à la base du calibre.

3. Résultats

- a. Dans le tube contrôle, les cellules se déposent dans le fond, formant un disque de forme et limites précises.
- b. Les réactions intermédiaires forment des agrégats irrégulièrement associés avec un halo de cellules finement agrégées.
- c. L'agglutination la plus grande se caractérise par la formation d'un dépôt d'érythrocytes uniformément agglutinés, couvrant tout le fond du tube.

Exemple :



- d. Les résultats s'expriment 0, 1, 2, 3 ou 4+.
- e. Le point final correspond à la plus haute dilution de la suspension virale que produit la plus grande agglutination (4 +). Cette dilution contient 1 unité HA (hémagglutinant) pour le volume utilisé. La dilution suivante plus petite (plus grande concentration) contient 2 unités HA, etc.

TECHNIQUE D'INHIBITION DE L'HEMAGLUTINATION

L'inhibition de l'hémagglutination (HI) se base sur l'inhibition de l'hémagglutine virale par les anticorps spécifiques. La preuve s'utilise pour détecter indirectement la présence d'un virus hémagglutinant. A cause de son caractère protéique, le virus conduit à la formation d'anticorps chez l'hôte. Si le sérum de l'hôte inhibe l'hémagglutination par le virus qui normalement le fait, ceci signifie que le virus était présent chez l'hôte.

1. Matériels

Suspension du virus

Antisérum spécifique

Erythrocytes citratés

PBS ou solution NaCl 0,85 % stérile

Tubes centrifuges stériles

Calibre de tubes de sérologie

Tubes de sérologie 12 x 72 mm, fonds courbe, stériles.

Pipettes de 1.0 et 10.0 stériles.

Centrifuge.

Bain marie 37°C

2. Méthodes

- a. Préparez dilutions doubles sériées de l'antisérum en PBS, en commençant par 1:10. Distribuez les dilutions du sérum en quantités de 0,2 ml en petits tubes de sérologie.
- b. Titrez l'antigène comme dans le test HA. Déterminez la dilution qui contient 4 unités pour 0,2 ml.

Exemple :

Si le titre HA du virus est 1:80, ceci représente 1 unité HA. Cependant, une dilution de 1:10 contiendra 8 unités HA en 0,4 ml ou 4 unités en 0,2 ml.

Agrégez 4 unités d'antigène en volumes de 0,2 ml à chaque tube d'anti-sérum.

c. Ajoutez les contrôles suivants :

- 1) Sérum, dilution 1:10, 0,4 ml
- 2) Antigène seul, 4 unités, 0,4 ml
- 3) Sérum positif connu, 1:10, 0,4 ml
- 4) Sérum négatif connu, 1:10, 0,4 ml
- 5) A titre de vérification d'erreur de dilution, ou de variation d'érythrocytes d'un lot à l'autre, réalisez une titularisation des 4 unités.

a) Placez 0,4 ml de PBS dans chacun des 5 tubes.

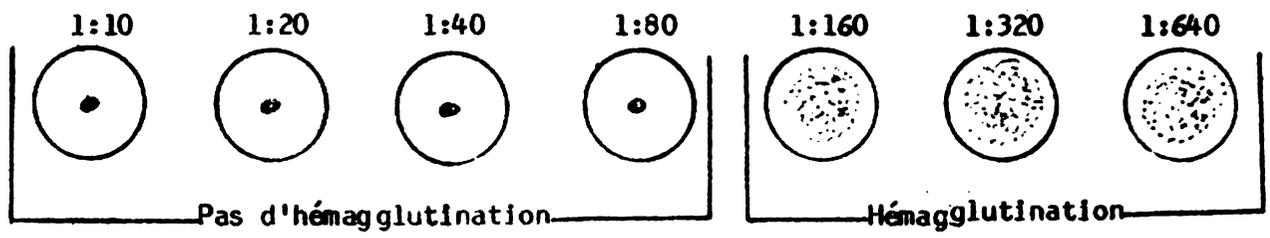
b) Au premier tube, agrégez-le 0,4 ml de la dilution de virus dans le cas antérieur 1:10) contenant 8 unités HA. Mélangez et transférez 0,4 ml au second tube. Continuez et retirez 0,4 ml du dernier tube.

d. Incubez à température du laboratoire durant 30 à 60 minutes.

e. Agréger 0,4 ml d'érythrocytes à 0,5 % à tous les tubes. Agitez. Placez tous les tubes à température appropriée jusqu'à ce que les cellules contrôle soient sédimentées complètement.

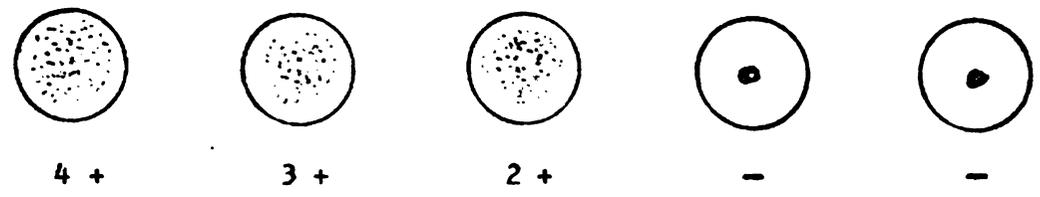
f. Lisez le titre du sérum, ceci correspond à la plus grande dilution de sérum qui inhibe l'héماغlutination par le virus qui s'exprime comme la réciproque de cette solution de sérum.

Exemple :



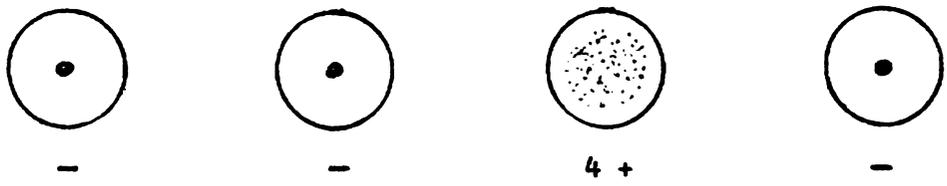
Titre du sérum : 80

g. Lisez la titularisation de l'antigène ainsi :



Seulement les trois premiers tubes doivent montrer l'agglutination, ce qui indique effectivement 4 unités HA par 0,2 ml furent utilisées dans le test. Si l'agglutination se présente dans plus de 3 tubes, la concentration de virus doit être changé (dilué) par addition de PBS. Si moins de 3 tubes présentent l'agglutination, la concentration de virus doit être augmentée ajoutant plus de virus

h. Lisez les contrôles :



- 1) Le sérum seul doit être négatif
- 2) L'antigène seul doit être négatif
- 3) Le sérum positif seul doit être positif
- 4) Le sérum négatif seul doit être négatif

IMMUNOFLUORESCENCE

DESCRIPTION DE LA TECHNIQUE

Matériel

1. MICROTOME

Instrument qui va nous permettre de découper les tissus en congélation amygdale , foie, etc) Ces coupes ne doivent pas dépasser la grosseur de 4 U, bien que l'idéal soit 2U.

Au cas où il n'existe pas cet appareil, on peut faire des impressions sur les porte-objets, par conséquent le diagnostic sera moins précis.

2. ACETONE

On ne doit pas employer de l'acétone à plus de 20°C, car dans cette situation l'évaporation se fait très rapidement.

3. TAMPON PHOSPHATE pH 7,2 (0,5 M)

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
KH_2PO_4	0,2 g
HNa_2PO_4 (anh.)	1,15 g
Eau distillée	1.000 cc

4. GLYCERINE TAMPONNEE pH 8,6

Carbonate-Bicarbonate pH9

Glycérine Pure: 7 parties	HNaCO_3	3,7 g
Carbonate-Bicarbonate pH 9: 3 parties		
	Na_2CO_3	0,6 g
	Eau Distillée	100 cc

5. MICROSCOPE DE FLUORESCENCE

Méthode

1. On réalise des coupes d'organes sélectionnés avec un microtome (amygdales - râle). Epaisseur: 2 - 4 U. Si on ne dispose pas d'un microtome, on peut faire des impressions sur porte-objets.
2. On fait sécher à la chaleur au moyen d'une lampe durant 10 minutes, ou bien on utilise une sécheuse.
3. On fixe en acétone, par immersion durant 15 minutes, Cela peut se faire à température ambiante, si celle-ci n'est pas trop élevée. On recommande que la température ne dépasse pas les 20°C. De toutes les façons on peut le faire en réfrigération.
4. On met la préparation en contact avec le conjugué fluorescent de telle sorte que la coupe soit complètement recouverte.

Il est très important d'employer le conjugué dans sa dilution optimale afin d'éviter une fluorescence inespécifique ou un excès de colorant qui traduirait une fluorescence de fond laquelle rendra difficile la lecture.

Les dilutions du conjugué nous les faisons avec PBS pH 7,2.



5. Incubation de l'échantillon

L'incubation se fait à 37⁰C en étuve durant 30 minutes. On doit la réaliser en chambre humide afin d'éviter la dessiccation de la préparation.

6. LAVAGE

On le fait avec PBS pH 7,2. Tout d'abord, on retire les restes du conjugué et on submerge les porte-objets dans PBS pH 7,2 durant 5 minutes. Cette opération se répète trois fois.

On recommande de faire un dernier lavage avec de l'eau distillée pour éliminer les possibles restes de sels du PBS, de cette façon, on évite les interférences au moment de la lecture au microscope.

7. MONTAGE DE LA PREPARATION

Une fois qu'on a lavé les préparations, on les fait sécher à l'air ou bien à l'aide d'une sécheuse. Ensuite on dépose une goutte de glycérine tamponnée sur la coupe et on la recouvre avec un couvre-objet.

8. OBSERVATION AU MICROSCOPE DE FLUORESCENCE



IMMUNOELECTROOSMOPHORESE

(POUR LA PPA)

Matériel

- Equipement d'électrophorèse, marque GELMAN LKB, ou d'autres semblables (Chambre d'électrophorèse, source d'énergie pour 500 volts, châssis portoirs, poinçons pour faire des cavités dans l'agarosa.
- Buffer acétate veronal pH 8,6 force ionique 0,1 (Barbitol Sodique 13,38 g acétate de sodium - (3H₂O) - 8,83 g eau distillée 1.500 ml. Adaptez à pH 8,6 avec de l'acide chlorydrique concentré.
- Agarosa à 0,6 % dans veronal.
- Antigène PPA.
- Antigène contrôle négatif.
- Azida sodique
- Sérum contrôle positif.
- Porte-objets (2.5 x 10 cm)
- PBS PH 7,2.

Méthodes

a) Préparation d'agarosa (0,6 %).

1. On mélange une partie d'acétate veronal buffer avec 2 parties d'eau distillée (force ionique 0,033).
2. On ajoute agarosa à 0,6% (SIGMA) et azida sodique à 0,1 %.
3. On la met au bain marie à 100° C ou à l'autoclave à vapeur fluente

durant 20 minutes. Le gel doit rester complètement transparent.

4. Ensuite on la distribue dans des flacons à raison de 40 à 60 ml par flacon. On la conserve bien fermée à +4°C, jusqu'à ce qu'on fera usage.

b) Antigène PPA

1. On cultive la ligne cellulaire MS (Monkey Kidney stable) dans des bouteilles pyrex, Povitsky ou des flacons Roux.
2. Quand le tapis est confluent, on procède à l'inoculation avec un virus PPA adapté à la ligne cellulaire d'infection 2/1. On laisse en adsorption pendant 2 heures. Après cette période, on ajoute le milieu de maintien (YLE avec 2 % de sérum de génisse) et on incube à 37°C.
3. Quand l'effet citopatique aura atteint toutes les cellules, en général aux environs de 48 heures post infection, on recueille la partie qui surnage avec toutes les cellules.
4. On centrifuge à 1.000 g durant 20 minutes.
5. On élimine la partie qui surnage et le sédiment cellulaire est suspendu à nouveau dans un double volume de PBS pH 7,2.
6. On soumet à l'ultrason pendant 3 minutes à 50 W dans un bain de glace.
7. Les cellules traitées à l'Ultrason sont centrifugées à 48.000 g durant 45 minutes à 4°C.
8. On recueille la partie qui surnage et on y ajoute de l'azida sodique pour donner une concentration finale de 0,01 %.

9. L'antigène se titre en bloc par rapport à un sérum PPA standard pour savoir la dilution optimale à employer.
10. On conserve à 0°C. L'antigène contrôle négatif se prépare avec la même méthode que le positif, en employant uniquement des cellules non affectées.

c) Réalisation du test

1. Les châssis avec 6 porte-objets chacun, sont placés sur une table nivelatrice.
2. On introduit une petite quantité d'agarosa fondue entre les joints des porte-objets pour bien consolider. Une fois fixés, déposez 10 ml d'agarosa à 45 - 50°C pour chaque 3 porte-objets en vue de former une couche uniforme de gel.
3. Quand l'agarosa se solidifie, placez les châssis dans une chambre humide pour leur stabilisation durant 30 minutes. Si on ne va pas en faire usage immédiatement, il vaut mieux les conserver dans une chambre humide.
4. Coupez les cavités dans le gel avec un emporte-pièce. Les cavités ont 3 mm de diamètre et sont séparées de 10 mm.
5. Remuez l'agar de la cavité de la cavité par succion à l'aide d'une trompe à vide.
6. Remplissez les cavités les plus proches de l'anode avec les sérums problème et une cavité avec le sérum contrôle positif et les plus proches de la cathode avec l'antigène.

7. Ensuite on place les châssis dans la chambre électrophorétique et on les applique un courant de 400 volts durant 30 minutes.
8. Passé ce temps, on les retire de la chambre électrophorétique et on procède à la lecture à la lumière indirecte.
9. Après, on les met dans du chlorure sodique à 2 % durant toute la nuit. On les lave pendant une heure dans l'eau distillée et ensuite on procède à la lecture finale.

d) Interprétation des résultats

- La ligne ou les lignes de précipitation se présentent proches du centre entre l'antigène et le sérum, quoique légèrement déviées vers le sérum.
- Doit être une ligne droite ou légèrement courbée.
- La formation de cette ligne nous indique la présence d'anticorps qui ont réagi avec l'antigène et par conséquent le sérum est positif à la PPA.
- L'efficacité de IEOP est à peu près la même que celle de la IFI, que celle de la immunodiffusion radiale (IDR) et plus grande que la double diffusion de Outcherlony (P.D. GA) (voyez table no. 5) dans les formes chroniques et inapparentes, cependant très inférieure à la IFI dans les formes subaigues.
- Cette méthode s'avère très rapide pour la détection des anticorps dans un nombre élevé de sérum .

ELISA PESTE PORCINA AFRICANA

A) REACTIVOS:

1.- Tampon Carbonato pH = 9,6

CO ₃ Na ₂ -----	1,59 grs
CO ₃ HNa-----	2,93 grs
H ₂ O dest.-----	1000 ml

Ajustar a pH =9,6.
Revisar el pH antes de ser usado.

2.- Solucion salina 0,85%

ClNa-----	85 grs
Tween 20-----	5ml
H ₂ O dest.-----	10 l

3.- Tampon O.P.D pH =5

Ac. Citrico-----	2,14 grs
PO ₄ HNa ₂ .2H ₂ O-----	3,54 grs
H ₂ O dest,-----	400 ml

4.- Tampon Fosfato Salino (PBS) - Tween 20 pH =7,4

ClNa-----	8 grs
PO ₄ H ₂ K-----	0,2 gr
PO ₄ HNa ₂ .12H ₂ O-----	2,9 gr
ClK-----	0,2 gr
Tween 20-----	0,5 ml
H ₂ O dest.-----	1000 ml

5.- Acido Sulfurico 3 N

Ac. Sulfurico *-----	16,1 ml
H ₂ O dest.-----	200 ml

*- SO₄H₂, densidad: 1,84, pureza: 99%.

Substrato

Tampón O.P.D ----- 50 ml
H₂O₂ (30%) ----- 20 lambdas
O.P.D *-----30 mgrs

* Dado el peligro potencial que representa esta sustancia, se recomienda la utilización de guantes y mascarilla durante la manipulación del producto en polvo Preparar antes de su utilización, en frasco opaco.
Sigma P-3888.

B) SENSIBILIZACIÓN DE LAS PLACAS CON EL ANTIGENO

Como soporte sólido se utiliza placas de 96 pocillos de Poliestireno. marca Dynatech Microelisa Mi29 B, desechables.

El antígeno (Vp 73) se emplea a la dilución óptima en Tampón Carbonato-bicarbonato pH =9,6 y se añade en cantidad de 100 microlitros (lambdas) por pocillo a la placa, la cual una vez cubierta se incuba durante 18 horas a 4 C. Transcurrido este tiempo de incubación se lava cuatro veces en solución salina con Tween-20 y a continuación se utiliza o bien, se puede conservar durante 5 meses a 4 C sin pérdida de título del antígeno.

Si la placa a utilizar ha estado conservada a 4 C se debe lavar al menos una vez en solución de lavado antes de colocar los sueros.

C) REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA

1.- Adición de sueros control y objeto de estudio:

Se utilizan a la dilución óptima de "screening" de 1/30 en PBS pH =7,2 con Tween 20. Se depositan 100 microlitros de cada dilución de los sueros por duplicado en todos los pocillos de la placa sensibilizada con el antígeno. Una vez cubierta la placa se incuba durante 1 hora a 37 C.

Cuando existan varios sueros a testar es recomendable realizar diluciones de los sueros en una placa separada, añadiendo 200 microlitros de PBS por pocillo, 10 microlitros de cada suero y otros 100 microlitros de PBS. Con estos últimos se homogeneizarán varias veces transfiriéndose su contenido a la placa sensibilizada con el antígeno

2.- Lavado:

Transcurrido el tiempo de incubacion se realizan 4 lavados en Solucion salina con Tween 20.

3.- Adicion del conjugado (proteina A - Peroxidasa):

La proteina A \$, se diluye a la concentracion de 25 ngr/100 microlitros en PBS pH =7,2 con Tween 20 y se anade en cantidad de 100 microlitros por pocillo de la placa. Una vez cubierta, se incuba durante 1 hora a 37 C.

\$- Sigma P-8651

4.- Lavado:

Se repite el punto 2.

5.- Adicion del Substrato:

La O.P.D.\$ se anade en cantidad de cien microlitros por pocillo a partir de la dilucion de trabajo descrita en el apartado de reactivos (6). La placa se incuba durante aproximadamente cinco minutos a temperatura ambiente vigilando constantemente los sueros control que son en definitiva los que indicaran el momento idoneo de frenado de la reaccion. Tener siempre preparada la solucion de frenado.

\$-Sigma P-3888

6.- Frenado de la reaccion:

Cuando los controles positivos y negativos alcanzan la coloracion adecuada la reaccion es frenada por la adicion de cien microlitros de acido sulfurico 3 N. Incubandose durante diez minutos a temperatura ambiente.

7.- Interpretacion de los resultados:

Los resultados pueden ser obtenidos por lectura visual o colorimetrica:

a) Lectura visual:

En funcion del color desarrollado por los controles positivos y negativos. Se denominaran a los sueros problema positivos en caso de presentar un color igual o mayor al control positivo. En cuanto a los sueros negativos seran aquellos que presenten igual o menor coloracion que el suero negativo control.

La placa es leída en un colorímetro a la longitud de onda de 450 nm. Los sueros positivos oscilan entre las 800 y las 1200 D.O. mientras que los negativos van desde las 200 a las 400. Manteniéndose por tanto una gran separación entre los sueros positivos de los negativos. Si la reacción fuera frenada antes de tiempo o la Proteína A estuviera a una concentración inferior los resultados serían sensiblemente más bajos pero siempre se podrán diferenciar los positivos de los negativos aunque quizás las diferencias no fueran tan grandes como las comentadas. Por el contrario si la reacción no es frenada a tiempo o la proteína A está muy concentrada se producirá color muy rápidamente tomando los controles negativos más color de lo normal. Como regla general si los controles no son adecuados repetir la prueba.

Las placas deben leerse utilizando como blanco la solución de sustrato y ácido sulfúrico.

D) GUIA PRACTICA DE PROBLEMAS:

En la práctica rutinaria del método Elisa, pueden surgir problemas que, en la mayoría de los casos, son muy simples y, por ello, se suele con frecuencia omitir su comentario. Los más frecuentes los podemos resumir a continuación:

PROBLEMA	POSIBLE FUENTE DE ERROR
Placas con color indiscriminado Poca diferencia entre los sueros Positivos de los Negativos.	Adsorción defectuosa. Conjugado mal titulado. Defectuoso lavado. Controles erróneos.
Placas sin coloración.	Conjugado muy diluido Sustrato mal pesado o caduco. Tiempo de incubación corto. Ausencia de controles po- sitivos.
Poca diferencia entre los sueros positivos y los ne- gativos.	Mala titulación del con- jugado. Sustrato muy diluido. Poco tiempo de incuba- ción del sustrato. Reactivos caducos.

QUATRIEME PARTIE : PARASITOLOGIE

- **Comptage des oeufs par gramme. Technique de Mac Master.**
- **Technique de SLOSS modifiée**
- **Comptage des Larves.**

NUMERATION DES OEUFS PAR GRAMME, TECHNIQUES DE MAC MASTER

Cette technique permet de faire une estimation du nombre d'oeufs, de larves et de coccidies présents dans un gramme d'un échantillon donné.

Le procédé est le suivant:

On prend deux grammes de matières fécales et on les dépose dans un récipient adéquat. On ajoute 28 ml de solution saturée de sel ou solution de sucre à 40%. Agitez bien jusqu'à la formation d'une suspension homogène. Tamisez à travers une toile métallique (augeo de cobre # 80) en pressant bien avec une spatule, le résidu qui se trouve dans le tamis, qu'on éliminera après. Agitez bien la suspension et prenez avec une pipette du matériel suffisant afin de remplir la cellule avant de procéder à la numération, on doit attendre au moins trois minutes pour permettre que les oeufs ou oocistes flottent et restent tous dans le même plan microscopique. La numération se fait à l'intérieur des zones délimitées dans la lame supérieure de la cellule. La numération de deux cellules par échantillon est suffisante.

On calcule le nombre total de coccidies ou oeufs de la façon suivante:

$$\text{Nombre d'oeufs par gramme} = \frac{\text{Numération Totale} \times 100}{\text{No. de cellules comptées}}$$

Ce calcul se base sur le fait que dans chaque cellule de la lame, on examine 0,15 ml (0,15 cm de profondeur pour 1 cm²). Si on devait examiner

la totalité de la suspension (30 ml) on aurait besoin de lire 200 cellules qui nous donneraient le nombre d'oeufs pour 2 gr. Le nombre d'oeufs pour 1 gr équivaldrait à la lecture de 100 cellules.

NOTES: Comme les oeufs ou les cocistes ont tendance à flotter, la pipette doit être remplie quand la suspension est en agitation continue et ce matériel doit se transférer rapidement à la cellule. Le remplissage des cellules sèches est parfois difficile, pour cela on recommande de les laver au début avec de l'eau courante.

TECHNIQUE DE SLOSS MODIFIEE

Cette technique permet de faire une évaluation du nombre d'oeufs dans un échantillon donné, de la même manière permet aussi de réaliser l'identification, en accord avec les caractéristiques morphologiques, d'un grand nombre d'oeufs de parasites gastro-intestinaux.

PROCEDE:

1. On pèse deux grammes de matière fécale prélevée directement du rectum et on les place dans un récipient adéquat.
2. Ajoutez 20 ml d'eau et agitez jusqu'à ce qu'on obtienne une suspension homogène.
3. Filtrez à travers d'un tamis métallique fin (augeo de cobre # 80).

4. Lavez le récipient qui contenait la suspension, avec 10 ml d'eau au plus, qu'on versera sur le contenu existant dans le tamis.
5. Avec une spatule on presse bien ce contenu de façon à extraire la plus grande quantité d'eau.
6. Déposez le liquide obtenu par filtration dans deux tubes d'essai de 15 ml. dûment numérotés et mettez-les au centrifuge pendant 5 minutes à raison de 1.500 R.P.M.
7. Retirez les tubes du centrifuge et éliminez le liquide qui surnage laissant 2 ml au-dessus du sédiment. Agitez le sédiment pour le suspendre à nouveau dans les 2 ml de liquide laissés dans le tube.
8. Remplissez les tubes avec la solution sucrée jusqu'à ce que le ménisque reste légèrement au-dessus des bords du tube. S'il se forme des bulles d'air, on doit les retirer du tube en introduisant une pointe de papier absorbant dans la bulle. On apporte les tubes au centrifuge et on place une petite lame de 22 x 22 mm. Centrifugez à raison de 1.500 R.P.M. durant 5 minutes. On doit éviter la formation de bulles en plaçant la petite lame sur le tube.
9. Retirez chaque petite lame lentement de manière verticale et ensuite les déposer sur une lame numérotée.
10. La lecture se fait au microscopie de lentille peu grossissante. Lisez le total des œufs dans chaque petite lame et additionnez les résultats.

tats. Ce total est considéré comme le nombre d'oeufs présent dans 2 gr de matières fécales; on n'a qu'à diviser par 2 ce résultat pour trouver le nombre d'oeufs présent dans un gramme de matières fécales.

11. Evitez que le centrifuge démarre ou s'arrête brusquement

Solution de sucre pour la technique de Sloss

Sucre	454 gr
Eau potable	355 ml
Phénol	6,7 ml

NOTE: Chauffez l'eau et ensuite ajoutez le sucre au fur et à mesure et agitez après. Le phénol s'agrège quand la solution est froide.

NUMERATION DES LARVES

Technique de Baerman

On utilise la technique de Baerman pour recueillir des larves vivantes à partir des tissus ou de la matière fécale. Elle se base sur le fait que par la mobilité des larves de némathodes qui une fois placées dans l'eau se dirigent au fond du récipient qui les contient, ce qui permet donc de les récupérer.

Matériel employé pour la technique de Baerman (Fig. 1)

- a. Entonnoir en verre ou en plastique
- b. Tube en caoutchouc uni à l'entonnoir
- c. Tube à essai uni au tube en caoutchouc
- d. Tamis en cuivre pour mettre la matière fécale.

Technique

1. Remplissez l'entonnoir avec de l'eau à 45°C. On doit éviter la formation de bulles dans le tube à essai comme dans le tube en caoutchouc, pour cela, on n'a qu'à comprimer le tube pour éliminer complètement les bulles d'air.
2. Déposer 5 gr de matières fécales dans un tamis métallique (le tamis doit être le plus serré possible afin d'éviter le passage du maté-

riel de sédimentation).

3. Déposez le tamis avec de la matière fécale à l'intérieur de l'entonnoir. L'eau doit couvrir complètement les matières fécales.
4. Laissez sédimenter les larves durant six heures ou préférablement d'un jour à un autre. Retirez le tube à essai et centrifugez à raison de 1.500 R.P.M. durant 5 minutes.
5. Décantez la partie qui surnage laissant à peu près 0,5 ml de sédiment. Agitez le sédiment et à l'aide d'un compte-gouttes vous le déposez sur une lame porte-objet pour son examen au microscope avec lentille peu grossissante.



