

APPENDICE 7

Epreuve d'agglutination directe

Organisme : Promastigotes obtenus *in vitro* à partir (d'une souche locale) de *L. donovani/L. infantum/L. chagasi*

Réactifs :

Solution de Locke :	Glucose	0,25 % (p/v)
	Chlorure de sodium	0,9 % (p/v)
	Chlorure de potassium	0,04 % (p/v)
	Chlorure de calcium	0,02 % (p/v)
	Bicarbonate de sodium	0,02 % (p/v)

Solution de citrate trisodique :	Chlorure de sodium	8,77 g
	Eau distillée	q.s.p. 1 000 ml

Ajuster le pH à 7,4 en ajoutant 0,056 M de citrate trisodique (16,46 g/1 000 ml)

Diluant : Utiliser la solution de citrate trisodique à pH 7,4 renfermant 1 % (v/v) de sérum foetal de veau inactivé par la chaleur *
et 0,1 M de 2-mercaptoéthanol (0,2 M pour les chiens).

Remarque * On peut remplacer le sérum foetal de veau dans le diluant par 2 % de gélatine. Ajouter la gélatine pour obtenir une concentration finale de 0,2 % (p/v), chauffer à 56°C pendant 10 mn pour dissoudre la gélatine, laisser refroidir à température ambiante, puis ajouter le 2-mercaptoéthanol.

Préparation de l'antigène

1. Recueillir des promastigotes par centrifugation à 4 000 g pendant 10 mn à 4°C.
2. Laver 5 fois en les mettant en suspension dans le liquide de Locke et en centrifugeant ensuite à 3 200 g pendant 10 mn à 4°C.

3. Préparer une solution de trypsine (0,4 % p/v Difco — 1/250 de trypsine) dans la solution de Locke puis ajuster le pH à 7,7.
4. Ajouter la solution de trypsine au culot de promastigotes dans la proportion d'un volume de culot pour 20 volumes de solution.
5. Bien mélanger pour remettre les promastigotes en suspension, puis laisser incuber pendant 45 mn à 37°C.
6. Centrifuger la suspension (3 200 g pendant 10 mn) puis laver (5 fois) comme au point 2.
7. Remettre le culot en suspension dans de la solution de Locke froide pour obtenir une concentration approximative de 2×10^8 cellules/ml.
8. Ajouter un volume équivalent de formaldéhyde dans la solution froide de Locke. Laisser agir jusqu'au lendemain à 4°C.
9. Centrifuger à 3 200 g pendant 10 mn à 4°C. Laver le culot avec la solution de citrate trisodique. Remettre en suspension à la même concentration que dans le point 8.
10. Ajouter du bleu coomassie pour obtenir une concentration finale de 0,1 % (p/v). Laisser la solution 90 mn en la remuant à vitesse modérée avec un agitateur magnétique.
11. Centrifuger (3 200 g pendant 10 mn) et laver le culot deux fois dans la solution de citrate trisodique.
12. Remettre en suspension dans une solution de citrate trisodique renfermant 0,4 % de formaldéhyde jusqu'à obtenir le même volume qu'au point 10.
13. Conserver à 4°C à l'abri de la lumière. **NE PAS CONGELER**

Mode opératoire pour l'agglutination directe

1. **Utiliser des plaques de microtitration** avec des cupules en forme de "V" et **non** de "U". Préparer la plaque en la numérotant et en remplissant le formulaire correspondant : numéro de la plaque, date et numéro de l'échantillon.
2. Diluer le sérum à tester au 1/100 avec le diluant solution de citrate trisodique/sérum foetal de veau/2-mercaptoéthanol. Laisser incuber 30 mn à 37°.

3. Dans une rangée de 12 cupules sur la plaque déposer 50 μl de diluant dans toutes les cupules sauf la deuxième.
4. Dans la deuxième cupule déposer 100 μl de la dilution au 1/100 du sérum à tester (voir point 1).
5. Transférer 50 μl de la cupule n°2 à la cupule n°3, mélanger puis transférer à nouveau 50 μl de la cupule n°3 à la cupule n°4. Continuer l'opération pour toute la série de cupules et jeter les 50 μl prélevés de la cupule n°12 à la fin.
6. Incorporer systématiquement des sérums témoins positifs et négatifs dans des cupules séparées.
7. **Remuer** doucement la solution d'antigènes pour remettre les organismes en suspension, puis déposer 50 μl dans la cupule n°1 (pas de sérum témoin). Déposer ensuite 50 μl d'antigènes dans la cupule n°12 puis dans la n° 11 et ainsi de suite jusqu'à ce que toutes les cupules aient reçu des antigènes.
8. Couvrir la plaque d'un couvercle ou d'un film en plastique, l'agiter doucement dans le sens des aiguilles d'une montre puis dans le sens contraire pendant 60 secondes et laisser incuber en position horizontale sur une surface à l'abri de chocs éventuels, jusqu'au **lendemain** et à température ambiante. Eviter soigneusement tout débordement accidentel d'une cupule dans une autre.

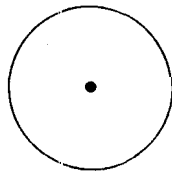
Lecture du test. Placer la plaque de microtitration sur une feuille blanche ou mieux sur une boîte lumineuse et observer la plaque du dessus. Deux personnes doivent lire indépendamment le test.

Point de virage. On considère que c'est la dernière cupule où l'on observe une agglutination, c'est-à-dire la cupule avant celle où apparaît une tache bleue aux bords bien nets comme un "bouton" dans le fond, identique à celle de la cupule témoin (n°1) où il n'y a pas de sérum.

On considère habituellement qu'un titrage $\geq 1/3\ 200$ signifie que l'épreuve de recherche de la LV humaine est positive (il arrive parfois d'utiliser des titrages plus bas dans le cas de la LV canine).

Il est possible de réutiliser les plaques de microtitration après avoir lu le test, à condition de les nettoyer soigneusement avec du laurylsulfate de sodium à 0,25 %, de les rincer suffisamment à l'eau distillée et de les laisser sécher à l'air. Mais il vaut mieux utiliser si possible des plaques neuves.

Figure :

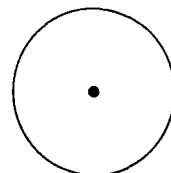
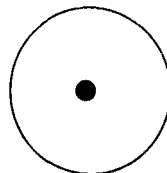
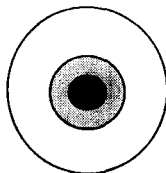
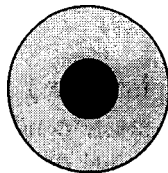
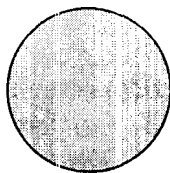


NEGATIF:

Point bleu foncé, de la même taille que celui de l'antigène de contrôle

POSITIF:

Taille de l'agglutination supérieure à celle de l'antigène de contrôle (D'une taille diffuse à celle d'un point)



100%
Titre AD

Titre Seuil