

## LEUCOSE BOVINE AGID

### SEROLOGISCHE DIAGNOSE VON ENZOOTISCHER RINDERLEUKOSE

In-vitro-Diagnostikum für Rinder

Die deutsche Gebrauchsinformation ist nach §17c TierSG amtlich zugelassen

**Zul.-Nr. FLI-B 542**

#### 1. ALLGEMEINES

Rinder, die von enzootischer Rinderleukose (ERL) betroffen sind, können Träger des Virus sein, ohne dass sie sichtbare klinische Symptome aufweisen. Trotzdem entwickeln alle infizierten Tiere, ob krank oder nicht krank, virusspezifische Antikörper.

Diese Antikörper treten in der Regel 8 bis 12 Wochen nach einer experimentellen Infektion auf. Ein negativer Serologietest zeigt an, dass das Tier in den 12 Wochen vor der Probenentnahme nicht infiziert worden ist.

Der AGID-Rinderleukose-Immundiffusionstest weist die Anwesenheit präzipitierender Antikörper gegen das Glykoprotein (gp51) der Virushülle und in geringerem Ausmaß präzipitierender Antikörper gegen das interne Protein (p24) nach.

#### 2. DARREICHUNGSFORM DES KITS

Ein Kit für 400 Serodiagnosen enthält:

- zwei Gefäße mit gefriergetrocknetem Antigen, die mit **1,6 ml** Verdünnungsmittel rekonstituiert werden,
- ein 5 ml-Gefäß mit Verdünnungsmittel für die Antigenrekonstitution,
- drei Gefäße mit "gebrauchsfertigem" positivem Referenzserum (RS),
- fünf 100 ml-Gefäße mit Agar für die Immundiffusion. In diesem Medium sind die Werte für pH und Ionenstärke genau eingestellt, was eine optimale Immundiffusion und/oder präzipitation ermöglicht.

#### 3. TECHNIK

##### 3.1 Materialien (nicht im Lieferumfang enthalten)

- Plattenträger : Standard-Petrischalen (90 mm Durchmesser) aus Glas oder Kunststoff;
- Agar-Schneider aus 7 kreisförmig angeordneten Zylindern zum Schneiden des Agars:
  - ein mittleres Loch mit 4 mm Durchmesser,
  - sechs randständige Löcher mit 6 mm Durchmesser,  
(Abstand von 3 mm zwischen den Rändern der randständigen Löcher und des mittleren Löches),
- Einstellbare Mikropipette 20-100 µl (mit Einwegspitzen).

##### 3.2 Agar-Zubereitung

- Das Gefäß mit Agar wird für 1,5 Std. in ein Bad mit kochendem Wasser gestellt.  
Nach dem Schmelzen sollte der Agar mindestens 30 min lang in ein Wasserbad bei  $+56 \pm 3^{\circ}\text{C}$  überführt werden.
- Die Glas- oder Kunststoff-Trägerplatte wird auf eine flache, horizontale Oberfläche gestellt.
- Mit einer vorgewärmten Pipette wird der Agar so verteilt, dass er eine Dicke von mindestens 2,6 mm hat. (Für eine Standard-Petrischale mit 90 mm Durchmesser werden 19 ml Agar benötigt). Man lässt den Agar abkühlen und fest werden, bevor die Löcher hinein geschnitten werden. Nach dem Verteilen des geschmolzenen Agars kann die Verfestigung durch Überführen der Platte nach  $+5 \pm 3^{\circ}\text{C}$  beschleunigt werden.
- Mit dem Agarschneider werden die 7 Löcher in den Agar geschnitten, wie in dem Diagramm Nr. 1 dargestellt. Die ausgeschnittenen Zylinder werden durch Absaugen entfernt.

### 3.3 Rekonstitution des gefriergetrockneten Antigens

- Das gefriergetrocknete Antigen wird mit 1,6 ml Verdünnungsmittel rekonstituiert.

### 3.4 Reaktion

Nach der Nummerierung der Löcher, wie im Diagramm Nr. 2 dargestellt, wird unter Verwendung einer Mikropipette mit Einwegspitze in folgender Reihenfolge pipettiert:

- 73 µl der zu testenden Einzelseren in die Löcher 2, 3, 5 und 6;
- 73 µl positives Referenzserum (RS) in die Löcher 1 und 4;
- 32 µl rekonstituiertes BLV-Antigen in des mittleren Loch.

Die Trägerplatte wird in einer bedampften oder feuchten Atmosphäre bei Raumtemperatur ( $+23 \pm 5^\circ\text{C}$ ) für mindestens 72 Stunden vor Licht geschützt aufbewahrt.

### 3.5 Anmerkungen

- 3.5.1 Es muss **eine sterile Pipettenspitze pro Reagenz und pro Serum** verwendet werden, um Kontamination zu verhindern.
- 3.5.2 Nicht gebrauchtes, rekonstituiertes Antigen muss bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren werden.
- 3.5.3 Während der Durchführung des Tests sollten die Reagenzien nicht bei Raumtemperatur belassen werden.
- 3.5.4 Die Materialien und Reagenzien sollten mit den üblichen Vorsichtsmaßnahmen gehandhabt werden und alle verwendeten Materialien müssen dekontaminiert werden.
- 3.5.5 Es wird empfohlen, die Agarplatten entweder am Tag zuvor oder am eigentlichen Testtag herzustellen.

### 3.6 Ablesen der Ergebnisse

Dem Amtsblatt der Europäischen Union (Richtlinie 88/406, Zeilen A-9) zufolge können die Ergebnisse nach 24 Stunden, dann nach 48 Stunden abgelesen werden, aber erst nach 72 Stunden wird ein endgültiges Ergebnis erhalten.

- a) Ein getestetes Serum ist positiv, wenn es eine Präzipitationskurve bildet, die für das Rinderleukosevirus-Antigen spezifisch ist, und wenn diese Kurve mit der Kontrollserumkurve übereinstimmt.
- b) Ein getestetes Serum ist negativ, wenn es keine Präzipitationskurve ergibt, die für das Rinderleukosevirus-Antigen spezifisch ist, und wenn es die Kontrollserumkurve nicht krümmt.
- c) Die Reaktion kann nicht schlüssig interpretiert werden:
  - wenn sich die Serumkontrollkurve zu dem Loch hin krümmt, der das Rinderleukosevirus-Antigen enthält, ohne eine sichtbare Präzipitationskurve mit dem Antigen zu bilden, oder
  - wenn sie nicht als positiv oder negativ interpretiert werden kann. Bei nicht aussagekräftigen Reaktionen sollte der Test unter Verwendung von konzentriertem Serum wiederholt werden.

Die Platten sollten vor einem schwarzen Hintergrund mit intensiver Seitenbeleuchtung abgelesen werden. Die Auswertung des Tests berücksichtigt das Vorliegen von Linien sowie die Verbindung oder Nicht-Verbindung zu den Präzipitationslinien, die zwischen dem BLV-Antigen und dem positiven Referenzserum (RS) erhalten werden (siehe Diagramm).

### 3.7 Spezialfälle

- 3.7.1 Wenn zwischen dem Antigen und dem positiven Referenzserum (RS) keine Präzipitationslinie zu erkennen ist, muss der Test wiederholt werden.
- 3.7.2 Wenn sich die Referenzlinie eindeutig zu dem Loch hin krümmt, der das Antigen enthält, und eine Tangente zu dem (den) Loch (Löcher), die das zu testende Serum enthält (enthalten), bildet, dann ist (sind) Letztere(r) leicht positiv (Diagramm 3, Serum C). Der Nachweis eines leicht positiven Serums ist schwierig: Die Krümmung der Referenzlinie sollte deutlich sein. Oft muss der Test wiederholt werden, bevor man sicher sein kann, dass ein solches Serum positiv ist (Diagramm 4, Serum E).
- 3.7.3 Wenn die Präzipitationslinien zwischen dem zu testenden Serum und dem Antigen auftreten und die Referenzlinie schneiden, handelt es sich um einen Fall von **unspezifischen Präzipitationslinien**, die das Ablesen der Präzipitationslinie erschweren können. Somit ist, trotz des Vorliegens dieser unspezifischen Präzipitation:  
- Serum K (Diagramm 5) positiv,  
- Serum H (Diagramm 4) negativ.
- 3.7.4 Bei einigen positiven Seren kann sich eine zweite spezifische Präzipitationslinie entwickeln, die dem Protein p24 entspricht (Diagramm 4, Serum F; Diagramm 5, Serum I).
- 3.7.5 Um eines Loch herum kann ein Hof auftreten, der durch Lipide und Lipoprotein im Serum hervorgerufen wird und das Ablesen der Präzipitationslinien erschwert. In diesem Fall ist:  
- Serum L (Diagramm 5) negativ.  
- Serum G (Diagramm 4) positiv.  
Wenn nötig, sollte der Test wiederholt werden.

HINWEIS: Aufgrund des Vorliegens mütterlicher Antikörper, die aus den Colostrum absorbiert werden, ist ein serologischer Test auf Rinderleukose bei Kälbern, die jünger sind als 6 Monate, nicht zu empfehlen.

## 4. AUFBEWAHRUNG

Das Kit sollte bei  $+5 \pm 3^{\circ}\text{C}$  vor Licht geschützt aufbewahrt werden.

NUR FÜR DEN VETERINÄRMEDIZINISCHEN GEBRAUCH / NUR FÜR DEN IN VITRO GEBRAUCH  
SYNBIOTICS EUROPE - 2 rue Alexander Fleming - 69367 LYON Cedex 07 - FRANKREICH  
Tel : +33 4.72.76.11.11 - Fax : +33 4.72.76.11.10  
www.synbiotics.com techsupport@synbiotics.fr

Ausgewiesene Stellen für den Umweltschutz

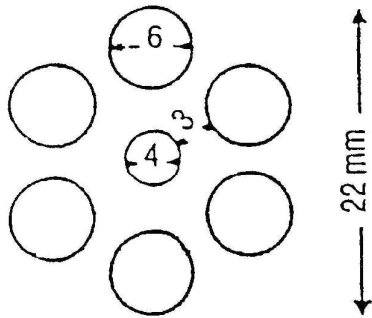
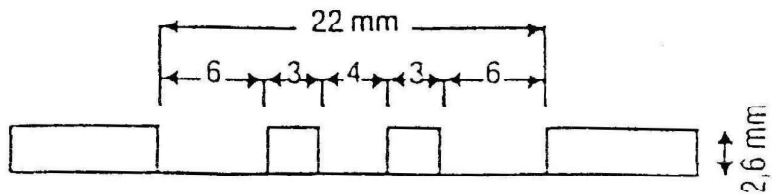


Diagramm Nr. 1

ZU TESTENDE  
SEREN

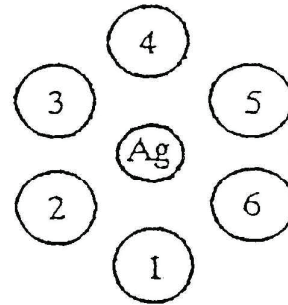


Diagramm Nr. 2

### INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

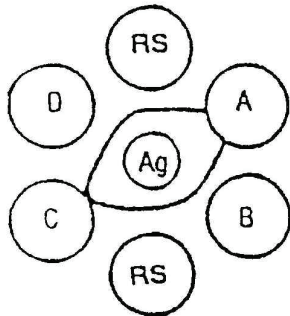


Diagramm Nr. 3

- RS: Positives Referenzserum mit einer Präzipitationslinie (gp51)
- A: Negatives Serum
- B & D: Positive Seren
- C: Leicht positives Serum

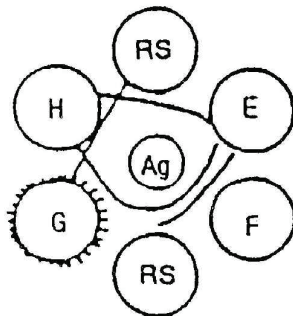


Diagramm Nr. 4

- RS: Positives Referenzserum mit einer Präzipitationslinie (gp51)
- E: Fragliches Serum
- F: Positives Serum mit zwei Präzipitationslinien (p24 und gp51)
- G: Positives Serum mit Hof
- H: Negatives Serum mit unspezifischer Präzipitationslinie (keine Ähnlichkeit mit dem Referenzserum)

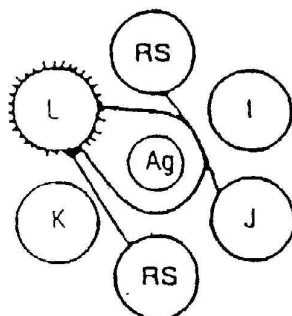


Diagramm Nr. 5

- RS: Positives Referenzserum mit einer Präzipitationslinie (gp51)
- I: Positives Serum mit zwei nicht getrennten Präzipitationslinien (p24 und gp51)
- J: Positives Serum
- K: Positives Serum mit einer unspezifischen Linie
- L: Negatives Serum mit Hof