

DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DE LA LEUCOSE BOVINE ENZOOTIQUE

1. GENERALITES

Les bovins atteints de leucose bovine enzootique (LBE) peuvent être porteurs de virus sans présenter de signes cliniques apparents. Cependant, tout animal infecté, malade ou non, élabore des anticorps spécifiques du virus. D'après les données expérimentales, ces anticorps apparaissent 8 à 12 semaines après l'infection. Une sérologie négative indique que l'animal n'a pas été infecté avant les 12 semaines précédant le prélèvement.

Le test d'immunodiffusion LEUCOSE BOVINE AGID révèle la présence d'anticorps précipitant la glycoprotéine de l'enveloppe virale (gp 51) et éventuellement la protéine interne (p24).

2. PRESENTATION DU COFFRET

Un coffret pour 400 sérodiagnostics contient :

- 2 flacons d'antigène lyophilisé à reprendre chacun par **1,6 ml** de solvant,
- 1 flacon de 5 ml de solvant pour la reprise de l'antigène,
- 3 flacons de sérum positif de référence BLV (SR) prêts à l'emploi
- 5 flacons de 100 ml de gélose pour immunodiffusion. Cette gélose présente des valeurs précises de pH et de force ionique permettant d'obtenir une bonne réaction d'immunodiffusion/précipitation.

3. TECHNIQUE

3.1 Matériel (non fourni dans le coffret)

- plaques support : boîtes de Pétri standard (90 mm de diamètre) en verre ou en plastique, ou plaques de verre,
- emporte-pièce constitué d'une rosace de 7 cylindres coupants pour former dans la gélose :
  - 1 puits central de 4 mm de diamètre,
  - 6 puits périphériques de 6 mm de diamètre,  
(distance entre bord du puits périphérique et du puits central : 3 mm),
- pipettes réglables permettant de délivrer 32 et 73  $\mu$ l (à embout jetable).

3.2 Préparation du support gélose

- Le flacon de gélose est porté au bain-marie bouillant pendant 1h 30. Une fois la gélose fondue, il est placé dans un bain-marie à  $+56^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  pendant 1/2 heure au moins.
- Le support de verre ou de plastique est placé sur une surface plane horizontale.
- A l'aide d'une pipette préalablement chauffée, verser la gélose en quantité nécessaire pour avoir une épaisseur d'au moins 2,6 mm (Prévoir une quantité de 19 ml de gélose pour une boîte standard de 90 mm de diamètre). Laisser la gélose se solidifier avant de creuser les puits. Cette solidification peut être obtenue en plaçant la boîte pendant une heure à  $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .
- A l'aide de l'emporte-pièce, creuser 7 puits dans la gélose selon le schéma n°1. Enlever par aspiration les petits cylindres de gélose ainsi découpés.

### 3.3 Reprise de l'antigène lyophilisé

- l'antigène lyophilisé doit être repris avec 1,6 ml de solvant.

### 3.4 Réaction

Les puits étant numérotés comme l'indique le schéma n°2, déposer à l'aide d'une micropipette à embout jetable, dans l'ordre suivant :

- 73 µl des sérums individuels à tester dans les puits 2, 3, 5 et 6,
- 73 µl de sérum positif de référence (SR) dans les puits 1 et 4,
- 32 µl d'antigène BLV réhydraté dans le puits central.

Placer les plaques support en atmosphère humide à température ambiante ( $+20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) pendant au moins 72 heures à l'obscurité.

### 3.5 Remarques

3.5.1 Employer **un embout stérile par réactif et par sérum** afin d'éviter toute contamination.

3.5.2 Congeler à  $-20^{\circ}\text{C}$  l'antigène réhydraté qui n'aurait pas été utilisé.

3.5.3 Eviter de laisser les flacons de réactifs à température ambiante lors des manipulations.

3.5.4 Matériel et réactifs doivent être manipulés avec les précautions d'usage, et l'ensemble du matériel utilisé doit être décontaminé après manipulation.

3.5.5 Il est recommandé de préparer les plaques de gélose la veille ou le jour même de leur utilisation.

### 3.6 Lecture des résultats

Extrait du Journal Officiel des Communautés Européennes (Directive 88/406 alinéa A-9) :

L'épreuve peut être lue après 24 heures, puis 48 heures, mais aucun résultat final ne peut être obtenu avant 72 heures.

a) Un sérum à tester est positif s'il forme une courbe de précipitation spécifique avec l'antigène du virus de la leucose bovine et si cette courbe coïncide avec celle du sérum de contrôle.

b) Un sérum à tester est négatif s'il ne donne pas une courbe de précipitation spécifique avec l'antigène du virus de la leucose bovine et s'il n'infléchit pas la courbe du sérum de contrôle.

c) La réaction ne saurait être considérée comme concluante :

- si elle infléchit la courbe du sérum de contrôle vers la loge de l'antigène du virus de la leucose bovine sans former une courbe de précipitation visible avec l'antigène ou,
- s'il n'est pas possible de l'interpréter comme négative ou comme positive.

Pour les réactions non concluantes, on peut répéter l'épreuve et utiliser du sérum concentré."

Les boîtes sont observées sur fond noir avec un éclairage oblique intense. L'appréciation des réactions tient compte de la présence de lignes et de leur raccordement ou non avec la ligne de précipitation obtenue entre l'antigène BLV et l'immunsérum BLV positif de référence (SR) (Voir schémas).

### 3.7 Cas particuliers

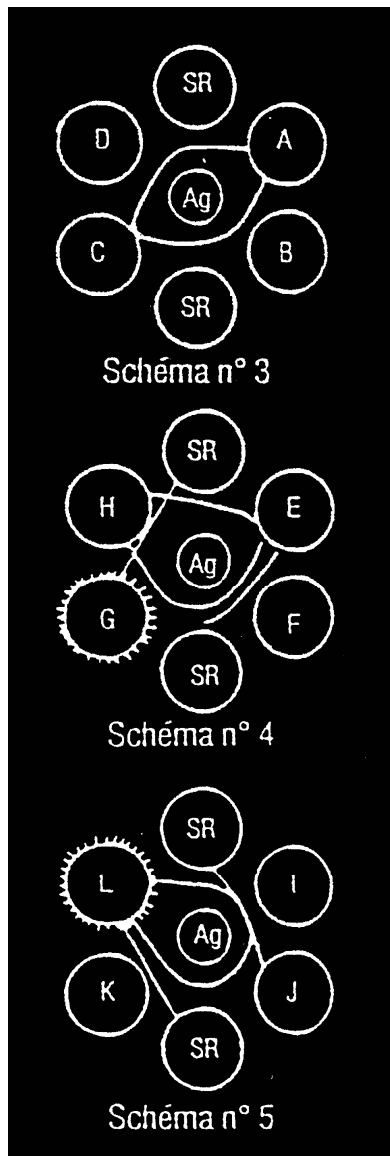
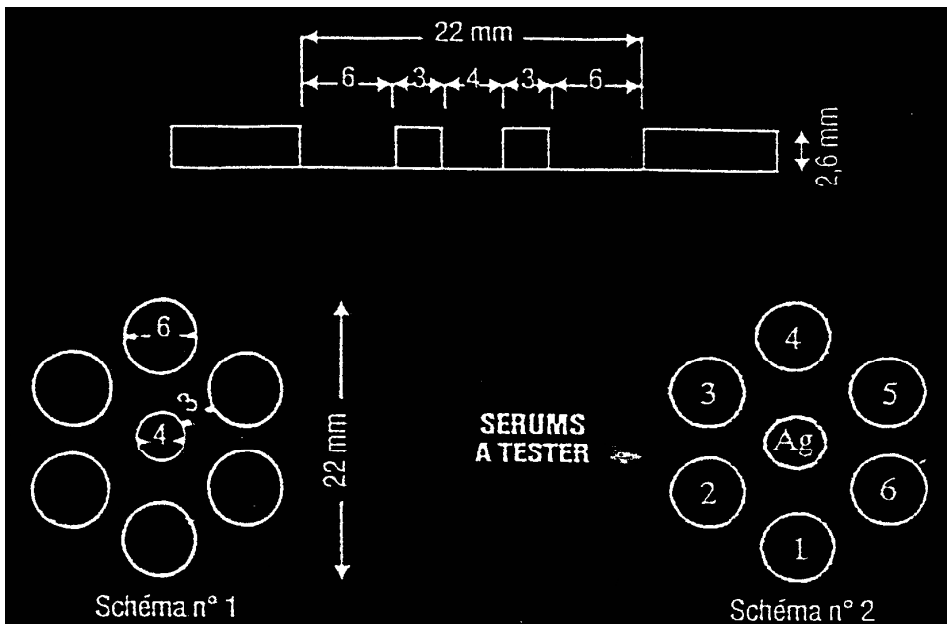
- 3.7.1 S'il n'y a pas de ligne de précipitation entre antigène et SR, le test doit être refait.
- 3.7.2 Lorsque la ligne témoin s'infléchit très nettement vers le puits de l'antigène et devient tangente au puits contenant le sérum à tester, ce sérum est faiblement positif (schéma 3, sérum C).  
La détection des sérums faiblement positifs est délicate ; il faut bien observer la courbure de la ligne témoin. Il est souvent nécessaire de répéter le test avant de se prononcer définitivement sur la positivité du sérum (schéma 4, sérum E).
- 3.7.3 Lorsque les lignes de précipitation entre le sérum à tester et l'antigène apparaissent et coupent la ligne témoin, il s'agit de **lignes de précipitation non spécifiques** ; elles peuvent gêner la lecture des lignes de précipitation spécifiques. Ainsi, malgré la présence d'une ligne de précipitation non spécifique :  
- le sérum K du schéma 5 est positif.  
- le sérum H du schéma 4 est négatif.
- 3.7.4 Certains sérums positifs peuvent présenter une 2ème ligne de précipitation spécifique correspondant à la protéine p24 (schéma 4, sérum F ; schéma 5, sérum I).
- 3.7.5 Il arrive également qu'un halo dû aux lipides et aux lipoprotéines des sérums apparaisse autour d'un puits, ce qui peut gêner la lecture des lignes de précipitation. Ainsi :  
- le sérum L du schéma 5 est négatif.  
- le sérum G du schéma 4 est positif.  
Si nécessaire, le test peut être refait.

N.B. : du fait de la présence d'anticorps maternels, résultant de l'absorption du colostrum, il sera déconseillé d'effectuer un dépistage sérologique de la leucose bovine chez les veaux âgés de moins de six mois.

## 4. CONSERVATION

Conserver le coffret entre  $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  et à l'obscurité.

POUR USAGE VETERINAIRE SEULEMENT / POUR USAGE IN VITRO SEULEMENT  
SYNBIOTICS EUROPE - 2 rue Alexander Fleming - 69367 LYON Cedex 07 - FRANCE  
Tel : +33 4.72.76.11.11 - Fax : +33 4.72.76.11.10  
www.synbiotics.fr info@synbiotics.fr



### INTERPRETATION DES RESULTATS

RS: Sérum positif de référence à une ligne de précipitation (gp51)

A: Sérum négatif

B & D: Sérum positif

C: Sérum faiblement positif

RS: Sérum positif de référence à une ligne de précipitation (gp51)

E: Sérum douteux

F: Sérum positif à 2 lignes de précipitation (p24 et gp51)

G: Sérum positif avec halo

H: Sérum négatif avec ligne de précipitation non spécifique (aucune continuité avec celle du sérum de référence)

RS: Sérum positif de référence à une ligne de précipitation (gp51)

I: Sérum positif à 2 lignes de précipitation (p24 et gp51)

J: Sérum positif

K: Sérum positif avec une ligne non spécifique

L: Sérum négative avec halo