

LEUCOSE BOVINE ENZOOTIQUE  
ÉTUDE EN COMMUN DE SÉRUMS  
PAR LE TEST D'IMMUNODIFFUSION EN GÉLOSE

Ph. NOUGAYREDE et J. PELLEN

Laboratoire national des médicaments vétérinaires  
La Haute-Marche - Javené - 35133 FOUGERES

=====

RESUME

*Le test d'immunodiffusion en gélose (I.D.G.) a été retenu par les experts de la C.E.E. comme test sérologique pour la recherche des bovins infectés par le virus de la leucose bovine enzootique. Actuellement, en France, une cinquantaine de laboratoires pratiquent ce test. Ces laboratoires, au cours de l'année 1981, ont participé à deux études en commun de sérums.*

*Le protocole détaillé (source des sérums, nombre d'échantillons, codage, volume à traiter, etc.) et les résultats obtenus sont présentés et analysés.*

° °

L'immunodiffusion en gélose (I.D.G.) appliquée à la leucose bovine enzootique, initialement réalisée par MILLER et OLSON en 1972 aux U.S.A. (2), est un test simple et commode retenu par le groupe d'experts de la Commission des Communautés Européennes pour le dépistage des bovins infectés dans les pays du Marché Commun.

En France, cette technique appliquée à la leucose bovine enzootique (L.B.E.) a été introduite par l'équipe du Professeur Parodi. A la demande de la Direction de la Qualité, des enquêtes sérologiques ont été entreprises ces dernières années afin d'évaluer l'importance de cette maladie. Les laboratoires départementaux des Services vétérinaires ont été sollicités. Plusieurs laboratoires volontaires ont testé chacun, dans le cadre d'une enquête départementale au cours de l'année 1981, environ 5.000 sérums.

Pour la mise en application de la Note de Service du 29 juin 1981 sur le cheptel officiellement indemne de leucose bovine (3), ces mêmes laboratoires se sont vus confier le sérodiagnostic par I.D.G. des animaux infectés par le virus de la leucose bovine (V.L.B.). Pour cela, des stages d'initiation pour le test d'I.D.G. appliqué à la leucose bovine selon la technique recommandée par la C.E.E. (1) ont été organisés, soit à l'Ecole nationale vétérinaire d'Alfort (Professeur Parodi), soit au Laboratoire Central

de recherches vétérinaires (Monsieur Larenaudie et Madame Rémond), soit au Laboratoire national des médicaments vétérinaires.

A cause du grand nombre de laboratoires intéressés, le problème de l'harmonisation des résultats s'est posé rapidement. Des études collectives de sérums ont été mises en place au cours de l'année 1981. Nous allons présenter le protocole et les résultats de deux études.

## I - MATERIELS ET METHODES

Deux études successives ont été entreprises. 48 laboratoires ont participé à la première et 55 laboratoires à la seconde. Le principe a été d'envoyer à chaque laboratoire une série d'échantillons constitués par des sérums, pour qu'ils soient testés en I.D.G. selon le protocole détaillé et les recommandations particulières données lors des stages d'initiation (4) (5).

### Première étude

Elle a porté sur des sérums sans difficultés, c'est-à-dire bien positifs ou bien négatifs. 4 sérums ont été utilisés :

- . Un sérum positif prélevé sur une vache infectée mais non cliniquement atteinte, donnant une ligne de précipitation (anti Gp 51) (n° 1, n° 3, n° 13, n° 16, n° 21).
- . Un sérum fortement positif, prélevé sur une vache atteinte de leucose clinique, donnant deux lignes de précipitation (anti Gp 51, anti P 24) confondues et intenses (n° 8).
- . Le même sérum dilué au 1/20<sup>è</sup> dans de l'eau distillée, donnant alors les deux lignes de précipitation bien distinctes (anti Gp 51, anti P 24) (n° 2, n° 6, n° 12, n° 14, n° 17).
- . Deux sérums négatifs, prélevés sur deux vaches non infectées (n° 4, n° 5, n° 7, n° 9, n° 10, n° 11, n° 15, n° 18, n° 19, n° 20).

Ainsi, les 21 échantillons numérotés au hasard de 1 à 21 ont été envoyés dans chaque laboratoire.

Les sérums, non stérilisés, ont été répartis dans des microtubes sous un volume de 500 µl, congelés à -20°C et expédiés à 4°C.

### Deuxième étude

Les 20 échantillons (numérotés au hasard de 24 à 43) ont été préparés à partir :

- . d'un pool de sérums négatifs prélevés à l'abattoir de Fougères (n° 24, n° 32, n° 41, n° 43).
- . d'un sérum positif prélevé sur une vache non cliniquement atteinte mais sérologiquement positive, donnant une ligne de précipitation (anti Gp 51) (n° 25 et n° 40).

- . d'un sérum positif, prélevé sur une vache non cliniquement atteinte mais sérologiquement positive donnant deux lignes de précipitation (anti Gp 51 et anti P 24) (n° 27 et n° 30).
- . d'un sérum positif, prélevé sur une vache cliniquement atteinte donnant deux lignes de précipitation (anti Gp 51; anti P 24) (n° 36 et n° 42).
- . d'un pool de sérums positifs donnant une ligne de précipitation (anti Gp 51) (n° 31 et n° 33).
- . d'un sérum négatif, prélevé sur une autre espèce, non sensible au virus, le cheval (n° 28).
- . d'un sérum positif, prélevé sur une vache infectée, le sang ayant été conservé quelques jours à la température du laboratoire afin d'obtenir un sérum fortement hémolysé (n° 37).
- . d'un sérum faiblement positif obtenu par dilution au 1/8ème (n° 35) et au 1/16è (n° 38, n° 39) d'un sérum positif dans de l'eau distillée.
- . d'un sérum de lapin immunisé avec du sérum de veau, réactif utilisé dans la préparation des antigènes, utilisé non dilué (n° 26) et dilué au 1/2 (n° 29).

## II - RESULTATS

### Première étude

Les résultats obtenus par les différents laboratoires lors de l'étude des 21 échantillons de sérums sont présentés sur la figure 1.

Les échantillons de sérums positifs sont trouvés positifs par l'ensemble des laboratoires, sauf l'échantillon n° 8.

Les échantillons de sérums négatifs ont été enregistrés par quelques laboratoires comme sérums positifs.

Le tableau I montre que 34 laboratoires (70,8 %) n'ont aucune divergence sur l'interprétation des échantillons des sérums. La grande majorité, 90 % des laboratoires, se situe dans le groupe n'ayant aucune divergence ou ayant seulement une divergence sur un sérum négatif.

*Tableau I : Divergences des résultats entre laboratoires au cours de la première étude.*

Divergences portant sur	Laboratoires	
	Nombre	Pourcentage
. Aucun sérum	34	70,8 %
. 1 sérum	9	18,7 %
. 2 sérums	1	2,1 %
. 3 sérums	3	6,3 %
. 4 sérums	1	2,1 %

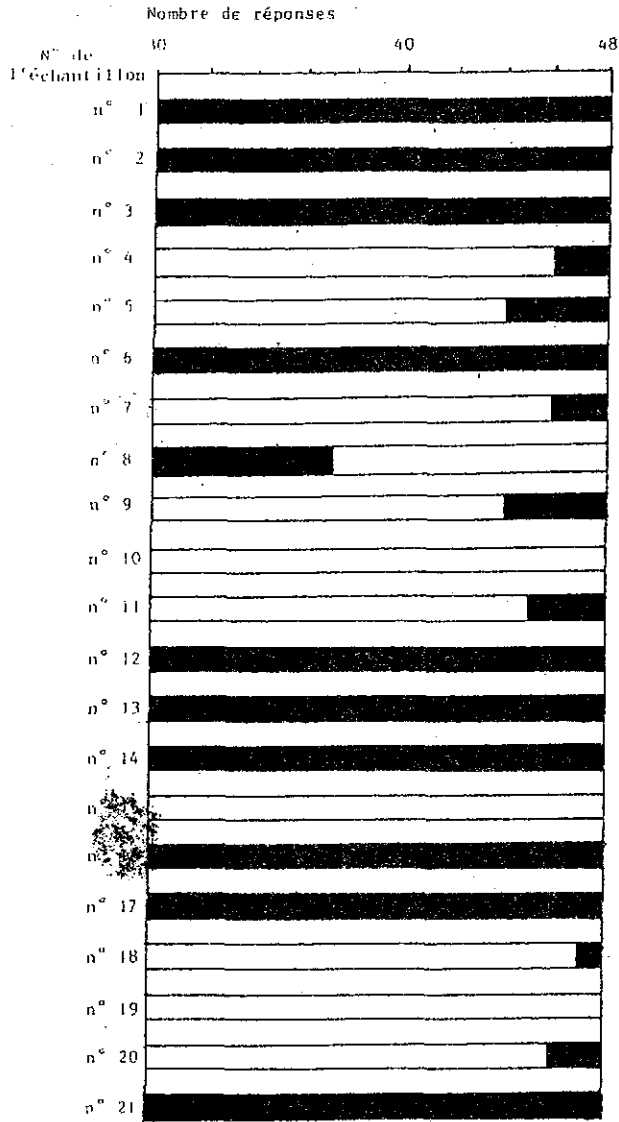


Figure 1 : Première étude : Résultats obtenus sur 21 échantillons analysés par 48 laboratoires.

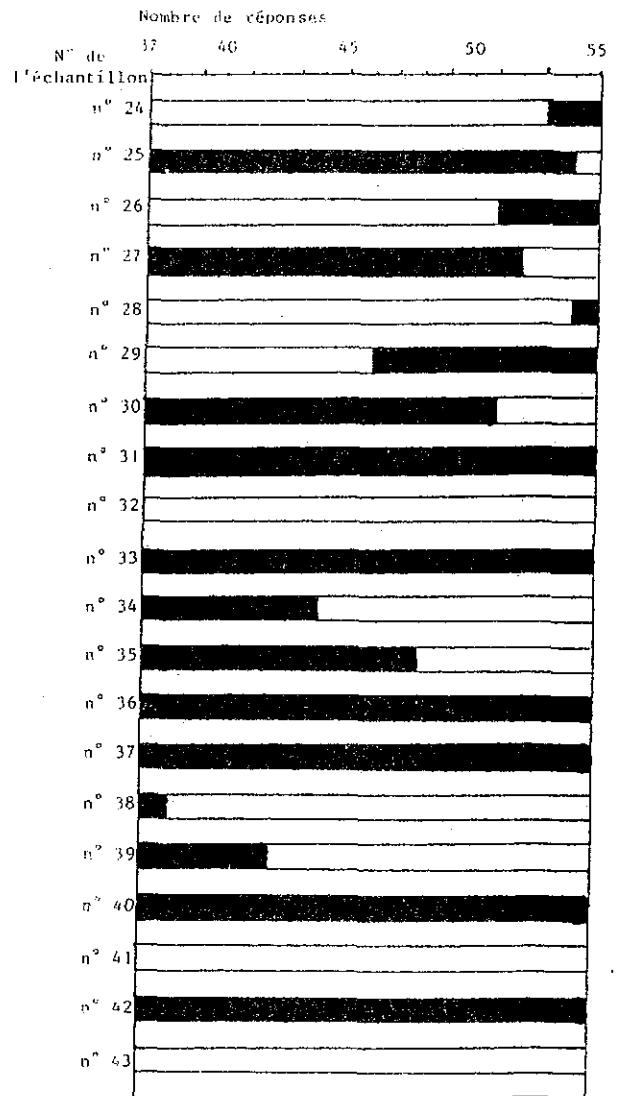




Figure 2 : Deuxième étude : Résultats obtenus sur 20 échantillons analysés par 55 laboratoires.

 positif  
 négatif

Deuxième étude

Les résultats obtenus par 55 laboratoires ayant analysé 20 échantillons de sérums sont présentés sur la figure 2.

Il apparaît, contrairement à la première étude, des variations plus importantes dans les résultats.

Les échantillons de sérums négatifs n° 24, n° 32, N° 41 et n° 43 ont été trouvés négatifs sauf deux fois. Tous les laboratoires ont trouvé négatif le sérum de cheval (n° 28).

Les échantillons de sérums positifs (n° 31, n° 33, n° 25, n° 40, n° 27, n° 30, n° 36 et n° 42) ont été donnés comme positifs sauf quelques exceptions.

Le n° 37, sérum hémolysé, a été trouvé positif par l'ensemble des laboratoires.

Les sérums (n° 29 et n° 26) préparés sur lapin pour obtenir un sérum négatif donnant une ligne de précipitation non spécifique n'ont pas été reconnus comme tel par l'ensemble des laboratoires.

Il en est de même des échantillons de sérums faiblement positifs, trouvés négatifs par un nombre important de laboratoires.

Le tableau II montre une plus grande dispersion des résultats que ceux observés lors de la première étude.

Seulement 25 laboratoires (45,5 %) donnent des résultats identiques. 19 laboratoires (34,5 %) ont de 2 à 5 divergences de résultats.

*Tableau II : Divergences des résultats entre laboratoires au cours de la deuxième étude.*

Divergences portant sur	Laboratoires	
	Nombre	Pourcentage
. Aucun sérum	25	45,5 %
. 1 sérum	11	20
. 2 sérums	8	14,5 %
. 3 sérums	2	3,6 %
. 4 sérums	6	10,9 %
. 5 sérums	3	5,5 %

III - DISCUSSION

Première étude

Elle portait sur des sérums sans difficultés particulières. Un seul sérum a posé des problèmes pour un certain nombre de laboratoires. 11 laboratoires l'ont donné comme sérum négatif avec fausse réaction, ne permettant pas d'observer la continuité avec le sérum positif de référence.

Une simple dilution du sérum permettait d'équilibrer le système et de mettre en évidence la continuité des lignes de précipitation avec le sérum positif de référence.

Les échantillons de sérums négatifs ont été enregistrés par quelques laboratoires comme sérums faiblement positifs. Ces résultats peuvent provenir :

- . soit d'une sévérité de lecture,
- . soit d'une erreur de manipulation (dépôt accidentel de sérum positif - infiltration sous la gélose de sérum positif...).

Ces erreurs peuvent être évitées d'une part en introduisant un sérum négatif de temps en temps à côté d'un puits contenant un sérum positif, ce qui permet d'observer la courbure de la ligne de précipitation du sérum positif près du puits du sérum négatif ; d'autre part, en refaisant les sérums non franchement positifs.

Une étude statistique (test Q de Cochran) a été effectuée en affectant du chiffre 1 les sérums positifs et du chiffre 0 les sérums négatifs. Le  $\chi^2$  d'ensemble a été trouvé significatif ( $\alpha = 5\%$ ). Après élimination des 4 laboratoires donnant des résultats divergents sur 3 sérums et plus, le test a permis de mettre en évidence qu'il n'y avait pas de différence significative entre les résultats des différents laboratoires au risque  $\alpha = 5\%$ .

Le bilan de cette première étude, globalement positif, a été communiqué aux différents laboratoires afin que chacun se situe parmi les autres laboratoires et en tire les conclusions pratiques.

#### Deuxième étude

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, l'introduction de deux difficultés (sérums faiblement positifs, sérums négatifs donnant une ligne de précipitation non spécifique) modifie notablement les résultats. Moins de la moitié des laboratoires donne une réponse convergente (25 sur 55).

Les échantillons de sérums négatifs donnant une précipitation non spécifique ont été jugés positifs 4 fois (n° 26) et 9 fois (n° 29). Il s'agit là d'une erreur grossière, laissant supposer qu'un certain nombre de laboratoires ont testé les échantillons sans sérum positif de référence, qualifiant de positif tout sérum donnant une ligne de précipitation.

Pour les échantillons de sérums n° 34, 35, 38 et 39, les résultats obtenus soulignent les difficultés de lecture qui apparaissent pour les sérums faiblement positifs et posent le problème de la sensibilité du test.

Cette deuxième étude illustre bien les difficultés rencontrées dans l'application de la technique d'I.D.G., d'une part, la non reconnaissance des sérums faiblement positifs et, d'autre part, l'existence de réactions non spécifiques.

Les laboratoires ayant donné des résultats divergents sur plus de 3 sérums, sauf si ces divergences portaient sur les sérums faiblement positifs, ce qui prouvait leur manque de sensibilité, ont reçu une deuxième série d'échantillons à étudier.

#### IV - CONCLUSION

Ces deux études, qui n'avaient pas pour but de distinguer des laboratoires satisfaisants et des laboratoires non satisfaisants, mais plutôt de faire le bilan de la période de mise en place du test I.D.G. en France, ont permis :

- . d'une part, à chaque laboratoire de porter un jugement sur son propre travail, apportant ainsi des améliorations dans sa façon de faire (faire des dilutions quand on a un sérum fortement positif, refaire plusieurs fois un sérum faiblement positif ou douteux, ne pas omettre le sérum positif de référence pour étudier la continuité des lignes de précipitation),
- . d'autre part, de faire apparaître la nécessité afin d'améliorer, pour certains, la sensibilité du test et d'obtenir pour tous les laboratoires un niveau de seuil de détection identique, de disposer d'un sérum seuil de positivité.

C'est une de nos préoccupations présentes. Un tel sérum, lyophilisé, permettra à tout laboratoire de vérifier si sa technique de diagnostic de routine est assez sensible.

Après cette période de mise en place du test d'I.D.G., lorsque chaque laboratoire pourra disposer d'un sérum seuil de positivité, en utilisant des antigènes contrôlés dans un laboratoire de référence, comme cela se fait déjà, ce type d'étude pourrait permettre de faire un contrôle de qualité aboutissant alors à une distinction entre les laboratoires satisfaisants et les laboratoires non satisfaisants.

BIBLIOGRAPHIE

1. Directive 80/1102/CEE modifiant la directive 64/432/CEE en ce qui concerne la leucose bovine enzootique - 11 novembre 1980. J.O. des Communautés Européennes, 1980, n° L 325/18 - 325/25.
2. MILLER J.M. et OLSON C.- Precipitating antibody to an internal antigen of the C-type virus associated with bovine lymphosarcoma. J. Nat. Cancer Inst., 1972, 49, 1459-1462.
3. Note de Service n° DQ/SVSA/N81/n° 8036 du 29 juin 1981 - Cheptel officiellement indemne de leucose bovine enzootique.
4. NOUGAYREDE Ph.- Interprétation de l'immunodiffusion double bidirectionnelle ou immunodiffusion d'Ouchterlony. Application à la leucose bovine enzootique. Bull. Lab. Vét., 1980, 2, 134-141.
5. PARODI A.L., REMOND M. et NOUGAYREDE Ph.- Stage de formation au diagnostic de la leucose bovine par immunodiffusion en gélose. Maisons-Alfort, les 12, 13 et 14 mai 1980. Edité par le L.C.R.V. Alfort.

REMERCIEMENTS

*Les auteurs remercient tous les laboratoires qui ont participé à ces deux études.*



## DISCUSSION

Question. Comment peut-on s'assurer que les sérums arrivent à destination à +4°C, alors que les transports peuvent durer 8 jours ?

Réponse. Les sérums envoyés aux laboratoires pour le contrôle de qualité sortent d'un congélateur à -80°C et sont mis dans de la glace, et les transports ne durent pas toujours 8 jours.

Q. A propos d'un transparent présenté lors de l'exposé des résultats, un des sérums (faiblement positif) devrait correspondre au seuil souhaitable de positivité pour la C.E.E. Ce sérum a été testé dilué au 1/8 et au 1/16 dans la chaîne d'analyse. Actuellement, un certain nombre de laboratoires français ne le détectent pas au 1/16 ni même au 1/8. Or, le seuil souhaitable de positivité devrait se situer à la dilution du 1/32ème pour ce sérum.

Q. Le contrôle de qualité n'est pas une fin en soi. Peut-on distinguer par la sérologie la leucose non contagieuse de la leucose contagieuse ? Faut-il diluer systématiquement tous les sérums suspects pour éviter qu'un excès d'anticorps ne masque la positivité de la réaction ?

R. Un sérum contenant un excès d'anticorps ne fournit pas une réponse comparable à celle d'un sérum négatif. En effet, un sérum fortement positif entraîne une inhibition de la formation du précipité du système témoin voisin et se trouve donc ainsi repéré. Ce phénomène justifie la nécessité de disposer dans chaque groupe de cupules de deux échantillons de sérum témoin positif (un au nord, un au sud).

L'immunodiffusion en gélose permet d'établir une distinction entre la leucose bovine enzootique et les autres formes de la leucose bovine puisque seuls les animaux infectés par le virus de la L.B.E. possèdent des anticorps correspondant à ce virus.

Q. Le premier contrôle avait été effectué avec un antigène fabriqué à Fougères. Le second a utilisé des antigènes du commerce. Tous les sérums ont-ils été testés à Fougères avec ces différents antigènes ?

R. Non. Pas pour cette enquête. Cependant, il faut préciser que par un accord tacite passé avec les producteurs, tous les antigènes sont testés à Fougères. La méthode utilisée est l'immunodiffusion radiale et tous donnent des résultats semblables.

R. Il faut dire également que les antigènes du commerce sont plutôt trop riches en antigène.

Un excès d'antigène entraîne comme corollaire une baisse de sensibilité. Chaque nouveau lot d'Ag qui arrive au laboratoire n'est jamais utilisé brut, tel quel. Au contraire, il est étudié à différentes dilutions pour déterminer celle qui fournit les meilleurs résultats.

La solution serait la préparation d'un sérum étalon, sérum qui s'avère indispensable et qui permettrait de vérifier la sensibilité de la technique employée dans chaque laboratoire.

Q. Une modification de l'emporte-pièce a-t-elle été envisagée ?

R. Non, pas encore.

Q. Est-il sans conséquence sur les résultats de diluer un sérum positif dans un sérum négatif ou dans de l'eau distillée ?

R. Non. C'est effectivement différent. Il faut respecter le protocole de manipulation et que tous procèdent de la même façon pour comparer les résultats.

R. C'est la même chose pour l'A.I.E. dont le diagnostic repose aussi sur l'immunodiffusion en gélose. Un sérum positif réagit différemment selon qu'il est dilué dans un sérum négatif, dans un tampon ou dans de l'eau distillée. L'eau distillée utilisée seule dans une cupule peut conduire à des images faisant conclure, à tort, à une réponse faiblement positive.

Q. Ne serait-il pas plus facile de créer un sérum étalon à partir d'un pool de sérums provenant de divers animaux ?

R. Pour une maladie bovine, sachant qu'un individu peut donner plusieurs litres de sérum, la question ne se pose pas. Ceci est suffisant pour constituer plusieurs milliers d'échantillons de sérum étalon. Peut-être pour une autre espèce animale, de petite taille.

Q. Dans quoi diluer l'antigène ?

R. Dans le tampon.

Q. Les producteurs fournissent avec l'antigène leur sérum de référence. Ils ne sont valables que pour cet antigène particulier.

Q. Lors du lancement de l'enquête officielle il y a eu beaucoup de réactions à faire et l'expérience quotidienne était grande. Maintenant, l'enquête a cessé. Les demandes d'analyses pour la leucose cessent ou arrivent en très petit nombre. D'une part, ces examens unitaires coûtent cher et ne sont plus rentables. D'autre part, l'expérience diminuant, comment assurer la qualité ? Que faire ?

R. Réduire le nombre des laboratoires qui font ces analyses.

Q. Quelle est la politique à suivre ? Doit-on toujours tout faire ou se spécialiser ? On ne peut pas continuer comme cela se passe actuellement.