



Dynamic Test Kits for R&D  
and Quality Control

**CV Test II**

**TEST IMMUNOLOGIQUE DE DETECTION  
PAR IMMUNO-DIFFUSION  
DU LAIT DE VACHE  
AJOUTE AUX LAITS DE CHEVRE OU DE BREBIS**

**Procédé INRA**  
Méthode officielle (J.O. du 1er Juin 1978)

## **Notice technique : CV Test II**

Version : Mai 2014

- Références (composition) :**
- 250101-1 (1 kit = 5 boîtes de 10 tests + 1 gamme étalon 0, 2%, 10%, 25%)
  - 250101-2 (2 kits = 10 boîtes de 10 tests + 1 gamme étalon 0, 2%, 10%, 25%)
  - 250101-3 (3 kits = 15 boîtes de 10 tests + 1 gamme étalon 0, 2%, 10%, 25%)
  - 250101-4 (4 kits = 20 boîtes de 10 tests + 1 gamme étalon 0, 2%, 10%, 25%)
  - etc...

**LIRE ATTENTIVEMENT AVANT UTILISATION DU KIT  
SE REFERER A LA NOTICE INCLUSE DANS LE KIT EN VERIFIANT SI CHANGEMENT DANS LE N° DE VERSION**

### I - PRINCIPE

L'échantillon (lait ou fromage) à analyser est déposé dans des cupules creusées dans une couche de gélose contenant un antisérum spécifique du lait de vache. Au fur et à mesure de la diffusion, les constituants du lait de vache reconnus par l'antisérum sont précipités. Le diamètre de ce précipité est proportionnel à la quantité de lait de vache présent dans l'échantillon.

### II - DOMAINE D'APPLICATION

La méthode s'applique au lait de chèvre ou de brebis cru ou chauffé (jusqu'à +60°C pendant moins de 30 secondes), frais ou conservé par congélation ou addition de bichromate de potassium ou de chlorure mercurique, ainsi qu'aux fromages frais et affinés.

### III - PREPARATION DES ECHANTILLONS

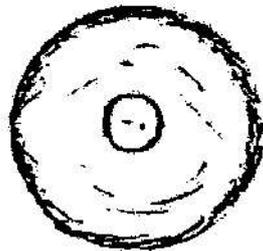
#### A. LAIT

- Pour environ 5 ml de lait, ajouter deux gouttes de présure concentrée, incuber de 15 minutes à +37°C et centrifuger 10 minutes à 3000 tr/min (Il est préférable d'utiliser une présure d'origine animale autre que bovine).  
Il est possible de remplacer l'adjonction de présure concentrée en la remplaçant par l'ajout de 50 µl d'acide acétique glacial pour 1 ml de lait).  
On obtient 3 phases : une couche de matières grasses, une couche intermédiaire opalescente qui contient le lactosérum et le culot de caséines.
- Prélever soigneusement 0.5 ml du lactosérum en évitant d'entraîner les matières grasses et le conserver si nécessaire à +4°C ou au congélateur pour un stockage de plus longue durée.

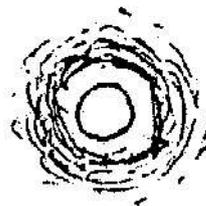
Remarque : La méthode s'applique également au lait entier à condition qu'il soit très frais (absence de grumeaux pouvant obturer l'aiguille de la micro-seringue), sinon le faire centrifuger.

Il est cependant déconseillé d'utiliser du lait entier lorsque l'on veut colorer les boîtes, car le lavage est alors imparfait et une auréole colorée persiste.

Un examen attentif permet cependant de différencier cette auréole d'un précipité spécifique (contours nets).



**SPECIFIQUE**



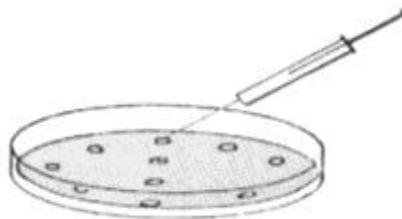
**NON SPECIFIQUE**

#### B - FROMAGE

- Peser 2 grammes de fromage, y ajouter 2 ml d'eau à pH 4 environ (acidifiée avec de l'acide acétique) et 4 ml de chloroforme.
- Homogénéiser avec un broyeur, centrifuger (3000 tr/min. pendant 10 minutes).  
(Cette phase peut être changée en laissant en contact le fromage broyé avec le chloroforme et l'eau acidifiée pendant 24 heures à température ambiante) centrifuger pendant 5 mn.
- Récupérer la phase supérieure limpide.

#### IV - MODE OPERATOIRE

- Déposer à l'aide d'une micro seringue 10 $\mu$ L de l'échantillon à analyser dans l'une des cupules d'une boîte de titrage.



- Dans chaque boîte de titrage, les trois échantillons de la gamme sont déposés dans trois cupules respectives. Utiliser le 0% de la gamme pour obtenir une autre concentration (par exemple : 5 % peut être obtenu par dilution 1/2 de l'échantillon 10 % avec l'échantillon 0 %).

- POUR UNE LECTURE PRECISE incuber 24 heures dans une étuve à +37°C

- POUR UNE LECTURE RAPIDE incuber 3 heures à +45°C

**(ATTENTION** : la relation diamètre des précipités sur la teneur en lait de vache n'étant pas linéaire à des teneurs supérieures à 10 %, ces échantillons doivent être ré analysés à +37°C pendant 24 heures pour obtenir un résultat précis.)

- Puis recouvrir la gélose d'acide acétique à 2 % pendant 5 minutes
- Vider l'acide acétique et rincer une fois avec de l'eau distillée
- Examiner la boîte en lumière oblique.

#### V - LECTURE DES RESULTATS

- La mesure des diamètres des précipités peut s'effectuer avec ou sans coloration, avec un double décimètre gradué au demi-millimètre ou mieux avec une loupe équipée d'un micromètre.
- En portant sur le graphique les diamètres mesurés pour la gamme-étalon, on obtient une courbe de référence. En reportant les diamètres trouvés pour chaque échantillon sur cette courbe, on détermine le pourcentage de lait de vache présent dans le lait de chèvre ou de brebis.

Voir exemple page 4

Diamètre mesuré : 80mm → Pourcentage trouvé : 10%

#### VI - INTERPRETATION DES RESULTATS

1. Pour des échantillons contenant plus de 50 % de lait de vache, il est conseillé de refaire l'analyse en diluant l'échantillon au 1/2.
2. Facteur de correction pour l'analyse du lait entier :  
Le lait entier diffuse légèrement moins vite que le lactosérum. La gamme-étalon étant réalisée en lactosérum, il sera nécessaire d'ajouter 10 % à la valeur trouvée pour du lait entier :  
(% lait de vache réel) = 1.10 x (% de lait de vache trouvé).
3. Facteur de correction pour l'analyse des fromages :  
Il doit être tenu compte de l'extrait sec des fromages analysés.  
Comparativement à la gamme en lactosérum, il faudra multiplier le résultat obtenu par un facteur de correction variable avec l'extrait sec du fromage :

EXTRAIT SEC EN %	30	40	50	60	70
Facteur de correction x le résultat par	3	2.5	2	1.5	1

#### VII - SENSIBILITE

La technique décrite permet de mettre en évidence 1 % de lait de vache dans le lait de chèvre ou de brebis.

Il est possible d'augmenter cette sensibilité en rechargeant les cupules après 30 minutes à 1 heure de diffusion à température du laboratoire (sans couvercle) avec 10 $\mu$ L d'échantillon. Recharger de même la gamme-étalon.

Il est également possible d'extraire les fromages à faible pourcentage d'extrait sec avec une quantité d'eau plus réduite. On augmente alors d'autant plus la sensibilité.

### VIII - CONSERVATION

- La date limite d'utilisation des CV tests et des gammes est mentionnée sur leur étiquette.
- Conserver les boîtes de Pétri à l'envers (la gélose en haut), dans un emballage plastique (température comprise entre +15°C et +18°C).
- Conserver les gammes de calibration à +4°C (durée de péremption de 6 mois).

### IX - POUR CONSERVER LES RESULTATS

- Incuber 24 heures à 37°C dans une étuve (ne pas recouvrir d'acide acétique).
- Laver les boîtes en effectuant 6 à 7 bains de chlorure de sodium à 9 ‰ de 10 minutes environ chacun. Agiter manuellement de temps à autre les boîtes.
- Sortir les boîtes et les vider.
- Remplir les boîtes de glycérol à 5 %. Laisser 10 minutes.
- Déposer à la surface de l'eau un disque de papier filtre du même diamètre que celui de la boîte, laisser couler le disque puis le maintenir contre la gélose tout en vidant l'eau glycinée. On doit ainsi éviter la présence de bulles (en particulier dans les trous) entre la gélose et le papier filtre.
- Laisser sécher une nuit sur une surface chaude (radiateur, etc...) ou en accélérant le séchage à l'aide d'un séchoir maintenu à une distance permettant de ne pas dépasser 45 à 50°C au niveau de la gélose (il faut environ 1h30).
- Recouvrir la gélose pendant quelques minutes avec de l'eau distillée pour permettre au papier filtre de se décoller progressivement.
- Retirer le papier filtre avec une pince et vider l'eau.
- Colorer les boîtes pendant 15 minutes avec du Noir-Amido à 1 ‰ dans l'acide acétique à 2 %.
- Rincer avec 5 ou 6 bains d'acide acétique à 2 % de 2 minutes chacun environ, de façon à bien décolorer les zones sans précipité, puis pendant 2 minutes avec de l'acide acétique à 2 % contenant 5 % de glycérol.
- Vider et sécher.
- Pour la lecture voir partie V

### XI - EXEMPLE

