

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV MA 009 - Version 3

Mars 2017

Détection du Cucumber mosaic virus (CMV), virus de la mosaïque du concombre sur Bananier (*Musa spp.*) par la technique sérologique ELISA

Laboratoire de la santé des végétaux
Laboratoire national de référence pour la détection des virus sur plantes tropicales

Le présent document est, sous sa forme électronique, mis à la disposition des utilisateurs en tant que méthode d'analyse. Ce document est la propriété de l'Anses. Toute reproduction, qu'elle soit totale ou partielle, n'est autorisée qu'à la condition expresse que la source soit citée, par exemple en faisant mention de sa référence (incluant sa version et année) et de son titre.



Historique de la méthode

Une méthode peut être mise à jour afin de prendre en compte des modifications.

Une modification est considérée comme majeure dès lors qu'elle concerne des parties clés ou le fond même de la méthode, dont la prise en compte est susceptible d'améliorer significativement la portée ou le résultat de la méthode d'analyse. Une modification majeure induit en général des adaptations importantes. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation.

Une modification est considérée comme mineure si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Les caractéristiques de performance de la méthode ainsi améliorée ne sont pas modifiées; elle n'a pas fait l'objet d'une nouvelle validation.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la présente méthode.

Tableau 1 : Historique des versions de la présente méthode.

Version	Nature des modifications	Date	Principales modifications
Version 1a *	Sans objet	Juillet 2010	Version initiale
Version 2a **	Majeure	Octobre 2012	Modification du schéma de détection, notamment en ce qui concerne les modalités de confirmation. Quelques améliorations, principalement sur des aspects formels
Version 3	Mineure	Mars 2017	Mise au format Anses. Pas de modification sur le fond de la méthode. Ajout des §6.2, 7.2, 7.3 et 10. Précisions apportées : -en introduction sur les éléments bibliographiques -dans le domaine d'application et le §5.5 sur les analyses portant sur autres matrices que les feuilles -sur le schéma de la méthode (§4) en reprenant uniquement ce qui relève de la présente méthode -dans le §5.2 en citant les références des réactifs sérologiques évalués positivement -dans le §8.1 en précisant une borne supérieure (en gramme) à la prise d'essai -dans le §9.2 en clarifiant le mode de détermination des seuils de positivité en cas d'absorbances très faibles des témoins sains

* Une consultation publique de la méthode a été organisée (notamment auprès des laboratoires agréés français) dans sa version 1a d'avril 2010 à juin 2010.

** Une consultation publique de la méthode a été organisée (notamment auprès des laboratoires agréés français) dans sa version 1b, renommée version 2a de avril 2012 à fin mai 2012.



Avant-propos

La méthode a été caractérisée et validée par l'unité « Ravageurs et pathogènes tropicaux » du Laboratoire de la Santé des Végétaux (LSV-RAPT), Laboratoire National de Référence (LNR) pour la détection du Cucumber mosaic virus.

Adresse : Anses - Laboratoire de la santé des végétaux – unité RAPT
3P, 7 chemin de l'IRAT, 97410 Saint-Pierre

Contact : saint-pierre.lsv@anses.fr

Les travaux méthodologiques effectués sur la méthode ont donné lieu à un rapport de validation (CMV_2010, avril 2010). Le rapport de validation, ainsi que la méthode ont été revus par des pairs scientifiques (CIRAD Réunion, Laboratoire de la santé des végétaux).



Sommaire

Avant-propos.....	3
Introduction	5
Avertissements et précautions de sécurité	6
1 Objet et domaine d'application.....	7
2 Documents de référence	7
3 Termes, sigles et définitions	7
4 Principe de la méthode.....	8
5 Réactifs	9
5.1 Eau.....	9
5.2 Réactifs sérologiques.....	9
5.3 Tampons	9
5.4 Autres réactifs et consommables	10
5.5 Contrôles et témoins	10
6 Appareillage et matériels	11
6.1 Broyeur	11
6.2 Spectrophotomètre.....	11
7 Échantillons.....	12
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons.....	12
7.2 Conservation des échantillons avant analyse	12
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse	12
8 Mode opératoire	13
8.1 Préparation des échantillons pour analyse	13
8.2 Broyage de l'échantillon	14
8.3 Déroulement du test sérologique.....	14
9 Résultats	15
9.1 Contrôle de la validité des résultats	15
9.2 Calculs et expression des résultats.....	15
10 Caractéristiques de performance de la méthode	17
Annexe 1 – Plan de plaque.....	18
Bibliographie	19



Introduction

La méthode décrite dans ce document permet de détecter spécifiquement le Cucumber mosaic virus (CMV) qui est l'agent responsable de la mosaïque du concombre sur bananier (*Musa* spp.).

Le CMV a une large gamme de plantes hôtes (près de 800 espèces végétales). Il a été décrit pour la première fois sur bananier en Australie en 1930 (Singh, Jones, and Jones 1995).

Il s'agit d'un virus du genre *Cucumovirus* qui se présente sous forme de virions isométriques de 29 nm. Son génome se compose d'ARN simple brin tripartite. Les souches de CMV sont classées en deux principaux sous-groupes (I et II) (Devergne and Cardin 1973, Palukaitis et al. 1992) :

- le sous-groupe I, dont les souches sont thermorésistantes à répartition principalement tropicale et subtropicale et décrites comme étant plus agressives sur plantes cultivées que les souches du sous-groupe II (Hord et al. 2001) ;
- le sous-groupe II, dont les souches sont thermosensibles et ne se rencontrent qu'en régions tempérées (Singh, Jones, and Jones 1995).

Les souches isolées sur bananier appartiennent majoritairement au sous-groupe I (Singh, Jones, and Jones 1995), mais certains auteurs décrivent aussi la présence de souches appartenant au sous-groupe II sur bananier (Hord et al. 2001).

Transmis de manière non persistante par plusieurs espèces de pucerons, la diffusion à distance du CMV se fait par le déplacement de matériel végétal infecté (rejets, souches, vitroplants).

La distribution du CMV varie considérablement entre feuilles d'un même plant de bananier. C'est dans les tissus conducteurs de la nervure centrale des jeunes feuilles que le virus est le plus concentré (Hu et al. 1995). Par conséquent, la prise d'essai devra, dans la mesure du possible, se faire sur feuilles jeunes (dernières feuilles sorties) en incluant une partie de la nervure centrale. Dans le cas où il y a des symptômes de nature à suspecter le CMV (mosaïque, marbrure et déformation des feuilles), la prise d'essai sera faite préférentiellement dans ces zones.

La méthode décrite dans le document est directement liée à la méthode d'analyse MOA 008 « Techniques ELISA » : elle ne peut être appliquée qu'en respectant les préconisations de cette méthode.



Avertissements et précautions de sécurité

Il convient que l'utilisateur de la présente méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité, et de s'assurer de la conformité à la réglementation nationale en vigueur.

Il est essentiel que les manipulations conduites conformément à la présente méthode soient exécutées par du personnel ayant reçu une formation appropriée.

Certains réactifs utilisés dans cette méthode peuvent présenter un risque pour l'utilisateur et/ou l'environnement, l'utilisateur doit impérativement suivre les recommandations du fournisseur pour l'utilisation de ces produits et l'élimination des déchets.

Par ailleurs, l'utilisateur de la présente méthode doit mettre en œuvre toutes les mesures nécessaires pour garantir la non-dissémination de l'organisme nuisible dans l'environnement.

Ainsi, tout fragment de matériel végétal infecté (ou de statut indéterminé) doit être détruit par autoclavage ou autre moyen inactivant les virus.

Les consommables ayant été en contact avec le matériel végétal infecté (ou de statut indéterminé) doivent être détruits par autoclavage ou autre moyen inactivant les virus.

Le matériel ayant été en contact avec le végétal infecté (ou de statut indéterminé) doit être désinfecté.



1 Objet et domaine d'application

Objet

La méthode permet de détecter la présence du CMV sur bananier par la technique sérologique ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).

Domaine d'application

La méthode s'applique sur feuilles de bananier fraîches ou déshydratées, symptomatiques ou asymptomatiques.

Dans le cas particulier de demandes d'analyses destinées à contrôler des plantes mères candidates à la production de vitro-plants, la méthode peut également s'appliquer sur d'autres organes végétatifs du bananier (gaines foliaires constituant le pseudo-tronc, hampe florale, souche ou bulbe ou rhizome, racines), dans ce cas, un ajustement du protocole peut être nécessaire notamment pour adapter le ratio de broyage (cf. §8.2) et les seuils de positivité.

2 Documents de référence

Tableau 2 : Liste des documents de référence (hors bibliographie).

	Référence	Titre
1	MOA 008	Méthode officielle d'analyse « Technique ELISA Bactériologie/Virologie »
2	MOA GLO 001	Glossaire des termes techniques en vigueur au Laboratoire de la santé des végétaux
3	Rapport de validation CMV_2010, Avril 2010	Rapport d'évaluation de la technique ELISA et des différents antisera disponibles pour la détection du CMV sur bananier

3 Termes, sigles et définitions

Les termes employés dans la méthode sont issus des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP...).

Le glossaire MOA GLO 001 reprend les principales définitions. L'attention des lecteurs est attirée sur le fait que les termes intégrés au glossaire ne sont, en règle générale, pas spécifiquement repérés dans le corps de la méthode d'analyse.

Les sigles sont explicités au fur et à mesure du texte.



4 Principe de la méthode

La technique ELISA utilise le principe d'une réaction immunologique, suivie d'une réaction enzymatique de dégradation d'un substrat. L'absorbance du milieu réactionnel, mesurée par spectrophotométrie, est d'autant plus élevée que la concentration en hydrolysate du substrat est importante.

Bien que produisant une valeur d'absorbance, il s'agit d'une méthode qualitative, c'est à dire dont la réponse est soit la présence, soit l'absence de l'organisme cible détecté dans une quantité d'échantillon donnée. Dans certains cas, une réponse indéterminée peut être obtenue.

Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme indemnes de la maladie ou contaminés à un niveau trop faible pour être mis en évidence par la méthode. Les échantillons pour lesquels une réponse positive est obtenue sont considérés comme contaminés.

Les échantillons pour lesquels des résultats indéterminés sont obtenus sont des échantillons pour lesquels la technique ne permet pas de statuer sur la présence ou non du virus.

La méthode peut être schématisée de la façon suivante :

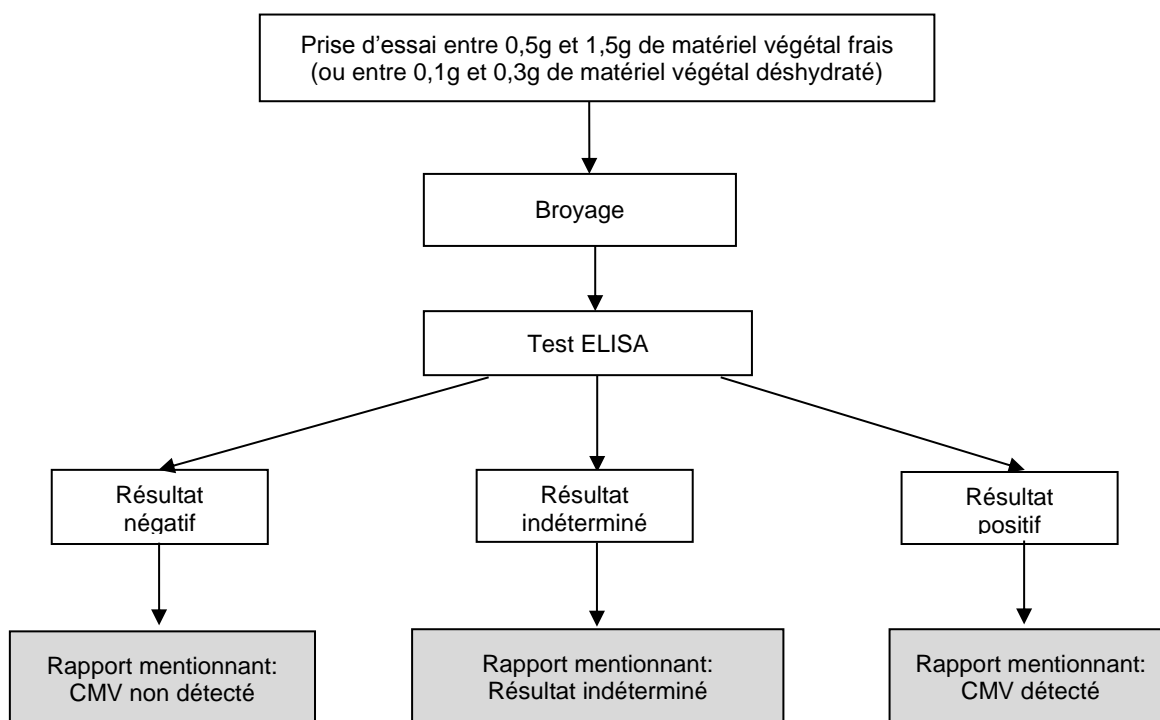


Figure 1 : Schéma de détection du CMV sur bananier.



5 Réactifs

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

En règle générale, l'utilisateur doit veiller (par l'utilisation de produits et consommables certifiés, nettoyage, stérilisation ou tout autre traitement approprié) à l'absence dans l'eau, produits et consommables utilisés, de contaminations ou de tout autre élément pouvant interférer sur le résultat.

Les recommandations des fournisseurs, concernant les conditions de stockage avant utilisation, seront suivies, ainsi que la conservation en cours d'utilisation. A défaut le laboratoire définira les conditions qu'il juge satisfaisantes.

5.1 Eau

L'eau doit être de qualité « analytique » (i.e. déminéralisée, distillée, osmosée,...) garantissant d'atteindre les critères de performance attendus pour les tests.

5.2 Réactifs sérologiques

Le laboratoire utilisera des réactifs sérologiques spécifiques du CMV et capable de détecter les deux principaux sous-groupes du CMV (I et II). La présente méthode a été caractérisée et validée de façon sensiblement équivalente avec les réactifs sérologiques AGDIA et PRI. Les références aux numéros de lots utilisés sont données avec le tableau de synthèse des caractéristiques de performance de la méthode (tableau 5).

Les réactifs sérologiques sont des réactifs critiques pour les analyses ELISA. Ils doivent faire l'objet de contrôles avant (ou parallèlement à) leur première utilisation conformément aux préconisations de la MOA 008.

5.3 Tampons

Composition et préparation

La liste des tampons nécessaires à la mise en œuvre de la méthode est la suivante :

- Tampon de lavage PBS-Tween
- Tampon de coating
- Tampon de blocage (facultatif)
- Tampon de broyage (ou d'extraction)
- Tampon de conjugué
- Tampon de substrat

Les tampons utilisés doivent être de préférence ceux préconisés par le fournisseur de réactifs sérologiques.

Le laboratoire peut aussi utiliser certains tampons communs à d'autres méthodes ELISA : le tampon de lavage, le tampon de coating et le tampon de substrat. Par contre, les tampons d'extraction et de conjugué doivent être ceux recommandés par le fournisseur de réactifs sérologiques.



Conservation

Pour les tampons commerciaux concentrés ou non : se référer aux recommandations du fournisseur.

Pour les tampons préparés au laboratoire :

- les solutions 1X : 1 mois à +5°C, sauf indication contraire ;
- les solutions 1X avec azide de sodium (dilution d'un tampon commercial concentré) : 3 mois à +5°C ;
- les solutions stock concentrées : au maximum 6 mois à température ambiante.

Certains tampons (tampons de blocage, certains tampons de broyage) doivent être préparés extemporanément, dans ce cas, il est conseillé de ne pas utiliser le tampon au-delà d'une journée.

5.4 Autres réactifs et consommables

-Plaques de microtitration (et couvercles): Utiliser des plaques de microtitration à fond plat de type NUNC Immunosorbent Maxisorp certifiées ou de toute autre marque assurant une qualité de réaction au moins équivalente.

-Substrat : à diluer dans du tampon de substrat selon les consignes du fournisseur. Pour un marquage à la phosphatase alcaline (le plus fréquent), le substrat est le p-nitrophényl phosphate (pNPP).

-Ethanol 70° (et éventuellement un produit détergent désinfectant de type Aniospray) : désinfection des surfaces de travail et du matériel.

5.5 Contrôles et témoins

Il est obligatoire d'intégrer des références de lecture sur chaque plaque de microtitration. Conformément aux exigences de la MOA 008, ces références sont constituées :

-des témoins sains (TS) : il s'agit de références "feuilles de bananiers non infectées".

Les témoins sains sont traités en parallèle et selon les mêmes conditions que les échantillons de feuilles de bananier à analyser. Ils sont au minimum trois, déposés dans six puits, à raison de deux puits par témoin. Dans la mesure du possible, pour des analyses portant sur d'autres matrices (pseudo-troncs, bulbes, ...), il convient d'utiliser des témoins sains de même nature que les matrices à analyser.

Ces témoins sains serviront à déterminer le seuil de positivité.

-des témoins malades (TM) : ils donnent au minimum l'assurance d'un déroulement correct de la manipulation. Pour chaque série d'analyses, on peut soit utiliser des échantillons végétaux contaminés (si possible *Musa* sp.) préparés au laboratoire (échantillons de référence naturellement contaminés) ou des témoins commerciaux positifs (lyophilisés, glycérolés...) à préparer selon les recommandations du fournisseur.

En complément d'un témoin malade (TM) à concentration virale élevée, il est conseillé, dans la mesure du possible, d'utiliser un témoin malade calibré (TMc) présentant des valeurs d'absorbances "calibrées" et situées en dessous des valeurs de saturation lors de la lecture de référence, c'est-à-dire dans la zone de proportionnalité substance colorante / valeur d'absorbance (par exemple présentant une absorbance comprise entre 0,1 et 1,2). Ce témoin permettra, au sein du laboratoire, de vérifier la reproductibilité entre microplaques et de détecter de petites anomalies de déroulement du test, susceptibles d'entraîner la non-détection d'échantillons faiblement infectés. Il peut s'agir de témoins positifs commerciaux utilisés à une dilution appropriée, lorsqu'ils existent et sont disponibles, ou de témoins dont le statut a été établi en interne.

-des témoins tampons (TP) : Il s'agit d'un essai blanc constitué uniquement du tampon de broyage pour le contrôle du bruit de fond sur le tampon de broyage.



-**et des témoins substrat** (appelés également puits substrat) : Une colonne des plaques de microtitration est remplie d'eau de qualité analytique à chaque étape de dépôt, excepté à la dernière étape où elle est remplie de la solution de substrat. Cette colonne permet de faire le "blanc" ou zéro optique sur le spectrophotomètre du lecteur de plaques de microtitration. Si l'appareil de lecture ne permet pas de produire automatiquement des valeurs d'absorbances corrigées, la moyenne des absorbances des puits substrat est soustraite de l'absorbance brute des essais.

L'utilisation de ces références sert à valider le bon déroulement des différentes étapes de l'analyse ainsi que les résultats obtenus sur les différentes microplaques.

6 Appareillage et matériels

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces matériels. Des matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

Pour la mise en œuvre de cette méthode, le laboratoire disposera des appareils décrits dans la MOA 008.

Afin d'alléger la lecture de la méthode, seules les valeurs cibles des grandeurs mesurées sont indiquées dans le corps du texte, en unités du système international ou unités dérivées. Les erreurs maximales tolérées (EMT) à prendre en considération sont données dans le tableau ci-après (dans le cas contraire, des spécifications sont précisées dans le texte de la méthode).

Tableau 3 : EMT par grandeur.

Grandeur	EMT
Volume	volume < à 10mL : EMT = $\pm 10\%$ volume \geq à 10mL : EMT = $\pm 5\%$
Masse	EMT = 10%
pH	EMT = 0,3 unité pH
Température	incubateur : EMT = $\pm 3^\circ\text{C}$ réfrigérateur : EMT = $\pm 4^\circ\text{C}$ (pour une température cible de $+5^\circ\text{C}$)
Temps	EMT = 10%

6.1 Broyeur

La méthode a été caractérisée et validée en utilisant un broyeur à bille (type Homex 6 de Bioreba), le broyage de l'échantillon se faisant dans un sachet de broyage en plastique, muni d'une gaze de filtration à mailles en nylon. Le broyat peut alors être récupéré directement dans le sachet. Toutefois, tout autre procédé de broyage permettant d'obtenir des résultats équivalents peut également être utilisé.

6.2 Spectrophotomètre

La méthode a été caractérisée et validée sur un spectrophotomètre de type TECAN SunriseTM. Tout autre spectrophotomètre adapté techniquement et métrologiquement à la lecture de microplaques ELISA peut être



utilisé à la condition de vérifier régulièrement sa conformité métrologique en termes de justesse, de répétabilité et de linéarité.

7 Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Cas d'échantillons frais : chaque prise d'essai est constituée au minimum de 0,5g de matériel végétal frais et au maximum de 1,5g de matériel végétal frais.

Le matériel végétal doit arriver au laboratoire dans un état de fraîcheur approprié (feuilles sans signe de sénescence ou de dessèchement).

Cas d'échantillons déshydratés (échantillons lyophilisés ou déshydratés selon la technique de BOS (Bos 1983)) la prise d'essai est constituée au minimum de 0,1g de matériel végétal déshydraté et au maximum de 0,3g de matériel végétal déshydraté. Les échantillons doivent être complètement déshydratés (sans développement de moisissures et conditionnés dans un conditionnement étanche à la vapeur d'eau).

Si la quantité de matériel végétal reçue au laboratoire est insuffisante, des réserves sont émises quant au résultat d'analyse si ce dernier est négatif.

Si les échantillons arrivent au laboratoire dans un état dégradé, le laboratoire émet des réserves sur tout résultat d'analyse négatif en précisant l'état dégradé de l'échantillon à la réception au laboratoire. Si les échantillons arrivent dans un état très dégradé, le laboratoire peut refuser l'analyse. Le refus d'analyse doit être motivé et doit être notifié au client dans les plus brefs délais.

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Le délai entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse doit être le plus court possible.

Pour les feuilles prélevées dans de bonnes conditions, le délai entre la réception des échantillons frais et le début effectif de l'analyse doit être de préférence inférieur à 3 jours et ne doit pas dépasser 5 jours. En attente de l'analyse, les échantillons seront conservés à +5°C.

Si les échantillons ne peuvent être traités dans ce laps de temps, ils seront congelés à une température inférieure ou égale à -18°C, en attente de traitement (maximum 1 mois). Dans ce cas, la prise d'essai doit être effectuée, si possible, avant la congélation.

D'autres modes de conservation peuvent être envisagés : la lyophilisation, la dessiccation par la méthode de BOS (dessiccation en présence de chlorure de calcium). Ces modes de conservation peuvent avoir une incidence sur la charge virale des échantillons : ils peuvent parfois induire des résultats faussement négatifs (échantillons faiblement contaminés détectés négatifs). Lorsque le laboratoire est contraint d'utiliser du matériel lyophilisé ou en BOS, le rapport d'analyse doit mentionner cette particularité : « Echantillon traité après conservation (citer le mode de conservation) »

7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Les laboratoires doivent conserver les reliquats pertinents (nature, quantité et qualité) de matériel soumis à analyse, dans des conditions appropriées garantissant leur intégrité (cf. tableau ci-après), jusqu'à au moins le quinzième jour calendaire suivant l'envoi au demandeur du rapport d'analyse. Dans le cas d'un résultat



positif ou indéterminé, ce délai est prolongé à 12 mois pour les reliquats qui le permettent selon les modalités détaillées dans le tableau ci-après.

Ce délai imposé est destiné à laisser le temps au demandeur de l'analyse de contester le résultat auprès du laboratoire (ce qui prolonge la conservation du reliquat jusqu'à l'issue de la contestation) et éventuellement de demander une analyse contradictoire ou une analyse de confirmation.

Tableau 4 : Types de reliquats d'échantillons à conserver et conditions de leur conservation pour les besoins d'analyses contradictoires et/ou de confirmation.

Etape	Type de reliquat	Conservation		Modalités d'envoi à un autre laboratoire le cas échéant
		Conditions	Durée	
Prise d'essai	Matériel végétal frais	+5°C	Tout résultat : 15 jours après envoi du rapport	Sachets individuels fermés et clairement identifiés Température ambiante Transporteur express avec suivi
	Matériel végétal déshydraté	Dans un environnement sec (exemple: en boîte hermétique) à température ambiante, ou en conditions réfrigérées	Résultat négatif : 15 jours après envoi du rapport Résultat positif ou indéterminé : 12 mois après envoi du rapport	Tubes/ pots hermétiques clairement identifiés Température ambiante Transporteur express avec suivi
Broyage	Broyat végétal	≤-18°C	Résultat négatif : 15 jours après envoi du rapport Résultat positif ou indéterminé : 12 mois après envoi du rapport	Tubes hermétiques clairement identifiés Température ambiante Transporteur express avec suivi

8 Mode opératoire

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

Pour le matériel déshydraté (échantillons lyophilisés ou en BOS), la prise d'essai est constituée de 0,1g de matériel végétal déshydraté et au maximum de 0,3g de matériel végétal déshydraté.

Pour le matériel frais, chaque prise d'essai est constituée de 0,5g de matériel végétal frais et au maximum de 1,5g de matériel végétal frais.

Remarque : Si l'échantillon est constitué de plusieurs feuilles d'un même bananier, ou si l'échantillon est constitué d'un plant entier, il convient de faire la prise d'essai sur les feuilles les plus jeunes (feuilles 1 à 4). Dans ces cas particuliers, la prise d'essai peut être réalisée en groupant plusieurs feuilles de façon à obtenir au moins 0,5g (et au maximum 1,5g).

L'utilisateur opérera selon une procédure adaptée à son contexte (infrastructures, organisation) qui vise à éviter tout risque de confusion entre échantillons ou de contamination d'un échantillon par un autre. Entre chaque prise d'essai, l'utilisateur veillera à désinfecter le matériel utilisé pour les prélèvements.



Suite à la prise d'essai, les reliquats de matériel végétal sont conservés selon les modalités indiquées dans le tableau 4.

8.2 Broyage de l'échantillon

Broyer le matériel végétal dans le tampon de broyage préconisé par le fournisseur de réactifs sérologiques et selon le ratio masse/volume préconisé par le fournisseur (généralement 1/10, soit par exemple 0,5g de matériel végétal frais pour 4,5mL de tampon), à l'aide d'un broyeur à billes, ou de toute autre méthode de broyage permettant d'obtenir des résultats équivalents.

Pour une prise d'essai sur matériel végétal déshydraté, le ratio préconisé est de 0,1g de matériel déshydraté pour 4,5mL de tampon (à adapter proportionnellement selon la masse de matériel déshydraté constituant la prise d'essai).

Les broyats obtenus doivent être conservés à +5°C et utilisés le plus vite possible (au plus tard dans la journée). Après dépôt, les broyats sont conservés selon les modalités indiquées dans le tableau 4.

8.3 Déroulement du test sérologique

Établir soigneusement le plan de distribution (plan de plaque) et d'identification des extraits (voir exemple en annexe 1). Chaque échantillon (prise d'analyse) est au moins répété 1 fois soit 2 puits par échantillon.

Suivre en priorité le protocole d'analyse du fournisseur de réactifs (étapes, durées d'incubation, volumes, dilutions). En absence de consigne précise du fournisseur de réactifs, et dans le cas d'une DAS-ELISA ou d'une TAS-ELISA, les consignes suivantes peuvent être appliquées :

Coating (Immunoglobulines IgG) : au moment de l'emploi, les IgG sont diluées (par exemple à 1/200^{ème} ou 1/1000^{ème}) puis homogénéisées dans du tampon coating. Remplir les puits des microplaques à raison de 100µL (ou 200µL) / puits.

Incuber à + 37°C ou à température ambiante, durée à fixer comprise entre environ 3h et 4h ; ou encore à +5°C pendant une nuit.

Lavages : au minimum 3 lavages, chacun comportant un temps d'incubation du tampon de lavage dans les puits d'environ 2 à 4 minutes avant de vider.

Dépôt des extraits : remplir les puits à raison de 100µL (ou 200µL) / puits avec les extraits de plante.

Incuber à température ambiante pendant environ 2h ou à +5°C pendant une nuit.

Lavages : au minimum 3 lavages, chacun comportant un temps d'incubation du tampon de lavage dans les puits d'environ 2 à 4 minutes avant de vider.

Conjugué (Immunoglobulines couplées à l'enzyme IgG-E) : au moment de l'emploi, les IgG-E sont diluées (par exemple 1/200^{ème} ou 1/1000^{ème}) puis homogénéisées dans du tampon conjugué. Remplir les puits à raison de 100µL (ou 200µL) / puits.

Incuber à + 37°C ou à température ambiante, durée à fixer comprise entre environ 3h et 4h ; ou encore à +5°C pendant une nuit.

Lavages : au minimum 3 lavages, chacun comportant un temps d'incubation du tampon de lavage dans les puits d'environ 2 à 4 minutes avant de vider.

Substrat : pour un marquage à la phosphatase alcaline (le plus fréquent), le substrat, p-nitrophényl phosphate, est mis en solution dans du tampon substrat, selon le ratio 1mg/ml. Remplir les puits des microplaques à raison de 100µL (ou 200µL) / puits. Incuber à + 37°C ou à température ambiante.



Lecture : pour le marqueur phosphatase alcaline et le p-nitrophényl phosphate comme substrat, la lecture se fait à 405 nm. Plusieurs lectures peuvent être réalisées à des temps différents.

S'il n'est pas prévu, par le fournisseur de réactifs, de bloquer la réaction enzymatique, les lectures peuvent être faites à environ 30mn, 1h et 2h, voire plus si nécessaire (réaction lente) après ajout de la solution de substrat.

En général, la lecture de référence utilisée pour calculer les seuils est effectuée à environ 2h.

Remarque : Pour éviter au cours du temps des variations non contrôlées des conditions environnementales pouvant avoir une incidence sur le déroulement des différentes réactions, il est prudent de réaliser ces opérations dans un environnement (température, hygrométrie, luminosité,...) défini et constant. L'utilisation de couvercles sur les microplaques et leur maintien à l'obscurité à des températures contrôlées durant toutes les phases d'incubation peuvent être des mesures préventives y contribuant.

Toutes ces étapes simples doivent être menées avec soin, constance et rigueur, notamment les opérations de lavage.

9 Résultats

9.1 Contrôle de la validité des résultats

L'observation et conformité à l'attendu des résultats obtenus sur les témoins décrits au §5.5 sont un préalable à l'interprétation des résultats obtenus sur les échantillons soumis à analyse. Ainsi les résultats des échantillons soumis à analyse ne sont interprétables qu'à partir du moment où tous les critères de validation des microplaques présentés dans la MOA 008 sont vérifiés.

9.2 Calculs et expression des résultats

Calcul des seuils

En absence de recommandations explicites, de la part du fournisseur de réactifs, l'interprétation des résultats peut se pratiquer sur la base du calcul de deux seuils, notés S1 et S2 :

$$S1 = \text{« Moyenne absorbances corrigées des TS »} \times 2$$

$$S2 = \text{« Moyenne absorbances corrigées des TS »} \times 3$$

Absorbance corrigée = absorbance brute – absorbance substrat (i.e. zéro optique effectué sur substrat seul).

Pour chaque échantillon, on considère la moyenne d'absorbance corrigée des 2 puits. Cette moyenne est comparée aux seuils S1 et S2.

Le recours à un mode de calcul différent peut être envisagé dans certaines situations (prendre contact avec le laboratoire national de référence).

Remarque: Sur des valeurs d'absorbance très faibles (induisant un seuil S2 <0,050 pour la lecture de référence à environ 2h), le calcul des seuils tel que décrit précédemment est non pertinent. En effet la valeur mesurée de l'absorbance est alors en dehors de l'intervalle de proportionnalité reliant l'absorbance à la concentration en substrat (de l'anticorps conjugué) mesurant la réaction de positivité. Dans ce cas, le seuil de positivité S2 peut être fixé à 0,050, ce qui induit à positionner un seuil S1 au deux tiers de la valeur de S2, soit $S1 = 0,033$.



Expression des résultats

L'analyse est qualitative, trois catégories de résultats sont définies : positif, indéterminé, négatif.

Positif : La moyenne des valeurs de l'absorbance de l'échantillon est supérieure ou égale à S2. Le résultat est : « Cucumber mosaic virus détecté dans l'échantillon analysé selon la technique ELISA ».

Indéterminé : La moyenne des valeurs de l'absorbance de l'échantillon est comprise dans l'intervalle [S1 ; S2]. Le résultat est : « Résultat indéterminé concernant la détection du Cucumber mosaic virus pour l'échantillon analysé selon la technique ELISA ».

Négatif : La moyenne des valeurs de l'absorbance de l'échantillon est inférieure à S1. Le résultat est : «Cucumber mosaic virus non détecté dans l'échantillon analysé selon la technique ELISA ».

Reliquats d'échantillons : cf. §7.3.



10 Caractéristiques de performance de la méthode

Synthèse des caractéristiques de performance extraite du rapport de validation établi par le LNR sous la référence CMV_2010, avril 2010.

Caractérisation effectuée avec les réactifs sérologiques :

- AGDIA (anticorps coating lot N°00839/00875; anticorps conjugués lots N° A : 01077/01122 et B :01076/01121);
- PRI (anticorps coating et conjugués lot avec date de péremption juillet 2009 et avril 2011);

Tableau 5 : Synthèse des caractéristiques de performance de détection du CMV, virus de la mosaïque du concombre sur Bananier (*Musa spp.*) par la technique sérologique ELISA.

Caractéristique	Paramètre	Résultat obtenu lors de la caractérisation	Principales informations relatives aux modalités de réalisation de la caractérisation
Sensibilité	Pourcentage d'échantillons détectés parmi les échantillons cibles	100%	14 échantillons cibles testés en triplicat (tableaux 7.1 et 7.2**): 3 plaques (2 puis/plaque).
Spécificité	Pourcentage d'échantillons non détectés parmi les échantillons non-cibles	100%	19 échantillons non-cibles testés en triplicat (tableaux 8.1, 8.2 et 8.3**): 3 plaques (2 puis/plaque).
Exactitude	Pourcentage de vrais positifs et de vrais négatifs parmi des échantillons cibles et des échantillons non-cibles	100%	14 échantillons cibles testés en triplicat (tableaux 7.1 et 7.2**) et 19 échantillons non-cibles testés en triplicat (tableaux 8.1, 8.2 et 8.3**): 3 plaques (2 puis/plaque).
Seuil de détection	Niveau de concentration le plus bas pour lequel tous les résultats (100%) sont positifs	10^{-3} .SM*	8 échantillons cibles à absorbance élevée en solution-mère (Abs>3) (tableau 10**), 6 niveaux de dilution (tableau 11**) : SM à $2 \cdot 10^{-5}$.SM ; chaque modalité est déposée en triplicat (3 plaques, 2 puits/plaque).
Répétabilité (interplaque)	Pourcentage d'accords entre résultats interplaques pour les mêmes échantillons	≥ 93%	8 échantillons cibles à absorbance élevée en solution-mère (Abs>3) (tableau 10**), 6 niveaux de concentration (tableau 11**) : SM à $2 \cdot 10^{-5}$.SM; chaque modalité est déposée en triplicat (3 plaques, 2 puits/plaque).

*SM=broyat dans le ratio 1/10 (par exemple 0,5g de matériel végétal frais pour 4,5mL de tampon de broyage)

** En référence au rapport de validation CMV_2010, avril 2010.



Annexe 1 – Plan de plaque

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	substrat*	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau
B	substrat*	Ech 1 Rep1				TS2					TMc	eau
C	substrat*	Ech 1 Rep 2				TS2					TMc	eau
D	substrat*	TS1									TP	eau
E	substrat*	TS1									TP	eau
F	substrat*	Ech 2 Rep 1								TS3	TM	eau
G	substrat*	Ech 2 Rep 2								TS3	TM	eau
H	substrat*	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau

Figure 2 : Plan de plaque

*eau sauf à la dernière étape où l'eau est remplacée par du substrat

Observations : Le "blanc" du lecteur de microplaques est réalisé sur la première colonne qui est chargée en solution substrat à la dernière étape.

Les extraits sont doublés verticalement.

Excepté pour la colonne 1 (puits substrat), les lignes et colonnes de bordure sont remplies avec de l'eau à toutes les étapes. Le tour d'eau n'est pas obligatoire si le système de couverture de la microplaque est étanche et que le laboratoire peut prouver qu'il n'y a pas d'effet de bordure.



Bibliographie

- Bos, L. 1983. "Order out of chaos: Preservation in BOS." In *Introduction to plant virology*, 160. Wageningen, Netherlands.
- Devergne, J. C., and L. Cardin. 1973. "Contribution à l'étude du virus de la mosaïque du concombre (CMV). IV. Essai de classification de plusieurs isolats sur la base de leur structure antigénique." *Ann. Phytopathol.* 5:409-430.
- Hord, M. J., A. Garcia, H. Villalobos, C. Rivera, G. Macaya, and M. J. Roossinck. 2001. "Field Survey of Cucumber mosaic virus Subgroups I and II in Crop Plants in Costa Rica." *Plant Disease* 85:952-954.
- Hu, J.S., H.P. Li, K. Barry, and M. Wang. 1995. "Comparison of dot blot, ELISA, and RT-PCR assays for detection of two cucumber mosaic virus isolates infecting banana in Hawaii." *Plant Disease* 79:902-906.
- Palukaitis, P., M. J. Roossinck, R. G. Dietzgen, and R. I. Francki. 1992. "Cucumber mosaic virus." *Adv Virus Res* 41:281-348.
- Singh, Z., R.A.C. Jones, and M.G.K. Jones. 1995. "Identification of cucumber mosaic virus subgroup I isolates from banana plants affected by infectious chlorosis disease using RT-PCR." *Plant Disease* 79:713-719.