Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTERE DE L'ALIMENTATION, DE L'AGRICULTURE ET DE LA PÊCHE

Direction générale de l'alimentation
Service de la prévention des risques sanitaires de la production primaire
Sous-direction de la qualité et de la protection des végétaux
Bureau des semences et de la santé des végétaux

Adresse : 251 rue de Vaugirard
75 732 PARIS CEDEX 15
Suivi par : Olivier Dufour
Tél : 01.49.55.81.64
Courriel institutionnel : bssv.sdqpv.dgal@agriculture.gouv.fr
Réf. Interne : BSSV/2010-MOD10.21 C 12/05/10

NOTE DE SERVICE

DGAL/SDQPV/N2010-8277

Date: 12 octobre 2010

Date de mise en application :	immédiate
Abroge et remplace :	Méthode DG1/98b (avis au JO du 2 en juin 2005).
Date d'expiration :	Sans objet
Date limite de réponse :	Sans objet
Nombre d'annexe :	1
Degré et période de confidentialité :	aucune

Objet : Méthodes d'analyse MOA 008 version 1a relative à la technique ELISA en bactériologie et virologie (phytopathologie)

Références : Article R 202 du code rural, décret 2006-7 du 4 Janvier 2006 relatif aux laboratoires nationaux de référence, ainsi qu'à l'agrément et à la reconnaissance des laboratoires d'analyses dans le domaine de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux, et modifiant le code rural, arrêté ministériel du 19 décembre 2007 fixant les conditions générales d'agrément des laboratoires d'analyses dans le domaine de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux

Résumé : Publication de la méthode officielle d'analyse MOA 008 version 1a relative à la technique ELISA en bactériologie et virologie pour les analyses officielles dans le domaine de la phytopathologie .

Mots-clés : Méthode officielle d'analyse - MOA - analyses - ELISA - détection - identification - bactéries - virus - végétaux - méthodes sérologiques - réactifs - antisera

Destinataires

Pour information :
- DRAAF-SRAL
- DAF-SPV
- LNPV
- Laboratoires agréés

Diverses techniques existent pour la détection des organismes nuisibles : sérologiques, moléculaires, isolement sur milieu,... Si les techniques moléculaires se développent, de nombreuses analyses de détection voire de confirmation de bactéries et virus phytopathogènes font encore appel à une technique sérologique. Ainsi, l'ELISA est encore beaucoup utilisée pour la détection des virus et dans une moindre mesure pour la détection ou l'identification des bactéries.

Indépendamment des organismes concernés, la mise en œuvre de cette technique dans le cadre d'analyses officielles nécessite de respecter un certain nombre d'exigences générales communes pour permettre d'atteindre les critères de performance attendus des méthodes.

La présente note a pour objet la publication officielle de la méthode générale MOA 008 version 1a « Techniques ELISA, Bactériologie/Virologie » .

Cette méthode officielle s'applique pour toutes les méthodes officielles réalisées à l'aide de cette technique, les dispositions particulières liées aux couples matrice / organismes nuisible étant précisées dans des méthodes officielles spécifiques.

Remarque : La MOA 008 remplace la DG1/98b publiée par l'avis au JO du 2 juin 2005.

Vous trouverez cette méthode officielle d'analyse MOA 008 version 1a en annexe de cette note de service d'information.

Le sous-directeur de la qualité et de la protection des végétaux
Robert Tessier

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTÈRE
DE L'ALIMENTATION
DE L'AGRICULTURE
ET DE LA PÊCHE

METHODE OFFICIELLE D'ANALYSE

TECHNIQUES ELISA

Bactériologie/Virologie

Réf. : MOA 008 version 1a



Droits de reproduction et Copyright

Le présent document est, sous sa forme électronique, mis gratuitement à la disposition des usagers du ministère chargé de l'agriculture en tant que méthode.

Le présent document est la propriété du ministère chargé de l'Agriculture, toute reproduction qu'elle soit totale ou partielle ne peut être effectuée qu'à la condition expresse que la source soit citée.

Dates de validité du présent document

Le présent document a valeur de méthode officielle à compter de sa date de publication indiquée ci-après. Il remplace alors *de facto* toute version antérieure.

Cependant, et sauf indication contraire explicite, la version précédente peut encore être utilisée pendant une durée maximale de 18 mois à compter de la date de publication de la nouvelle version, afin de tenir compte des cycles d'accréditation auxquels sont soumis les laboratoires de référence, agréés et reconnus officiellement.

Ce document étant susceptible d'évolution, il est de la responsabilité exclusive des utilisateurs de vérifier régulièrement qu'ils disposent bien de la dernière version.

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

MOA 008	Consultation publique		Validité	
Numéro de la version	Début	Fin	Début	Fin
DG01/98a	-	-	1998	Juin 2005
DG01/98b	-	-	Juin 2005	Janvier 2011[1]
MOA 008 version 1a	Avril 2010	Septembre 2010	Octobre 2010	

[1] Les antisera étant des réactifs critiques dont la qualité doit être contrôlée pour assurer la qualité des analyses, la durée de validité de l'ancienne méthode officielle (DG01/98b) est raccourcie et portée à 3 mois.

SOMMAIRE

PREAMBULE 5

Objet des méthodes officielles 5

Glossaire, abréviations et documents connexes 5

Limites imposées aux laboratoires agréés ou reconnus 5

Échantillonnage et échantillon 5

Modification des méthodes officielles 5

Considérations d'ordre métrologique 6

Obligations réglementaires et limites de responsabilité 6

Revue des méthodes officielles, amendement et modification 7

ORIGINE DE LA METHODE 7

PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE 8

Modifications 8

Améliorations 8

DESCRIPTION DE LA METHODE 9

1. Objet. 9
2. Domaine d'application. 9
3. Présentation schématique de la détection 10
4. Produits et consommables 11
   - 4.1. Les antisera 11
     - 4.1.1. Choix du fournisseur par le laboratoire utilisateur 11
     - 4.1.2. Contrôles effectués par le laboratoire utilisateur 12
   - 4.2. Tampons 13
   - 4.3. Plaques de microtitration 13
   - 4.4. Substrat de l'enzyme 13
   - 4.5. Autres consommables 13
5. Appareillage et matériel 13
   - 5.1. Petit matériel : 13
   - 5.2. Gros matériel : 14
6. Contrôles et témoins (références de lecture) 14
   - 6.1. Référence de lecture de l'absorbance (puits substrat) 14
   - 6.2. Contrôle positif (témoin malade : TM) 15
   - 6.3. Contrôle négatif (témoin sain : TS) 15
   - 6.4. Référence tampon d'extraction (Tp) 16
7. Etapes de l'analyse 16
   - 7.1. Plan de plaque 16
   - 7.2. Dépôt des anticorps de capture (coating) 16

7.2.1. Dépôt 16
7.2.2. Incubation 17
7.2.3. Lavage(s) 17
7.3. Dépôt des extraits 18
7.3.1. Dépôt 18
7.3.2. Incubation 18
7.3.3. Lavage(s) 18
7.4. Dépôt des anticorps conjugués 18
7.4.1. Dépôt 18
7.4.2. Incubation 19
7.4.3. Lavage(s) 19
7.5. Dépôt du substrat 19
7.5.1. Dépôt 19
7.5.2. Incubation 19
7.6. Autres étapes éventuelles complémentaires 19
8. Résultats 20
8.1. Validation des résultats 20
8.1.1. Lecture des plaques de microtitration 20
8.1.2. Vérification de l'interprétabilité des résultats avant exploitation des valeurs d'absorbance 20
8.2. Interprétation et formulation des résultats 21
8.2.1. Critères d'interprétation des lectures : détermination de seuils 21
8.2.2. Détermination et formulation du résultat d'analyse 23
9. Elimination des matériels susceptibles d'être contaminants 24
10. Conservation des reliquats de matériels utilisés 24

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE 25

REMERCIEMENTS 25

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE 26

ANNEXE I. Exemple de plan de plaque 28

ANNEXE II – Tableau de correspondance 29

PREAMBULE

OBJET DES METHODES OFFICIELLES

Les méthodes officielles, au sens du décret 2006-7 du 4 Janvier 2006, sont les méthodes validées par le ministère chargé de l'agriculture pour l'utilisation dans le cadre des actes officiels relevant de ses services (plans de contrôle et de surveillance, contrôles à l'importation et à l'exportation…). Ces méthodes concernent le diagnostic, la détection ou l'identification d'organismes nuisibles aux cultures, d'organismes envahissants ou d'organismes génétiquement modifiés pour le domaine d'application précisé dans la méthode.
Ces méthodes servent de « méthodes publiées » au sens de la norme ISO 17025 pour l'accréditation des laboratoires par le COFRAC.

GLOSSAIRE, ABREVIATIONS ET DOCUMENTS CONNEXES

Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans les méthodes officielles du ministère chargé de l'agriculture est issu des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP…).
Le glossaire 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 des méthodes officielles.
Certains documents (composition de milieux et tampons…) peuvent être communs à plusieurs méthodes officielles. Pour faciliter leur harmonisation et leur mise à jour, ils sont rassemblés dans des recueils spécifiques, considérés comme faisant partie intégrante des méthodes officielles. Les méthodes officielles appellent alors ces documents spécifiques en donnant leur code tel que repris dans les recueils.

LIMITES IMPOSEES AUX LABORATOIRES AGREES OU RECONNUS

Le ministère chargé de l'agriculture peut proposer ou imposer aux laboratoires, agréés ou reconnus, de stopper l'analyse à une certaine étape précisée dans la méthode officielle et, le cas échéant, de transmettre le matériel nécessaire à la poursuite de l'analyse dans un autre laboratoire, agréé ou de référence. Il est de la responsabilité de chaque laboratoire de veiller à suivre les contraintes définies par son périmètre d'agrément ou de reconnaissance et par les exigences du ministère.

ÉCHANTILLONNAGE ET ECHANTILLON

L'échantillonnage est de la responsabilité des préleveurs et ses modalités sont définies par ailleurs.
L' échantillon reçu est réputé être homogène en l'état de sa réception, par contre, il n'est pas forcément représentatif du lot d'où il provient et le laboratoire ne pourra en aucune façon attester du caractère représentatif au sens de la statistique.
Le laboratoire peut être amené à séparer l'échantillon reçu en sous-échantillons pour les besoins de l'analyse, il s'agit alors d'une simple division et non d'un réel sous-échantillonnage au sens de la statistique, et le laboratoire n'a pas, de ce fait, à être accrédité pour l'échantillonnage.

MODIFICATION DES METHODES OFFICIELLES

Sur le principe, seules les méthodes officielles peuvent être utilisées dans le cas d'analyses officielles, sans aucune modification. Néanmoins, et afin que les laboratoires puissent mieux utiliser leurs ressources et valoriser leur expérience, la possibilité leur est laissée d'utiliser des méthodes dérivées ou alternatives, ou de remplacer un réactif-clé à la condition expresse que le LNR ait validé la modification.

Une méthode dérivée résulte de modifications de portées limitées appliquées à la méthode officielle (par exemple, remplacement d'une procédure d'extraction de l'ADN par une autre, utilisation d'un appareil de préparation de l'échantillon différent de celui prévu dans la méthode officielle…).
Une méthode alternative s'appuie sur des principes ou des technologies différentes de celles décrites dans les méthodes officielles, il s'agit réellement d'une autre méthode.
Un réactif-clé (ou critique) est un réactif directement impliqué dans la reconnaissance des organismes recherchés.

Les laboratoires agréés évaluent les conséquences de la modification (d'une méthode par une autre ou d'un réactif-clé par un autre) conformément aux prescriptions du LNR et transmettent le dossier d'évaluation correspondant au LNR pour validation de cette modification.

Tout autre modification (qui n'a pas d'incidence prévisible sur le résultat) doit néanmoins faire l'objet d'une documentation apportant la preuve qu'elle n'interfère effectivement pas avec le résultat. Cette documentation est tenue en permanence à disposition du LNR.

Le ministère chargé de l'agriculture peut souhaiter faire profiter l'ensemble des laboratoires réalisant des analyses officielles des avantages que peuvent représenter les méthodes dérivées et alternatives qui lui sont proposées, en intégrant certaines modifications à l'occasion d'une révision de la méthode officielle. Le laboratoire à l'origine de l'amélioration est, dans ce cas, cité dans la méthode officielle.

CONSIDERATIONS D'ORDRE METROLOGIQUE

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

Volume	**volume < à 10 mL** : EMT = ± 10% **Volume ≥ à 10 mL** : EMT = ± 5 %
Masse	EMT = 10%
pH	EMT = ± 0,3 u
Température	**incubateur** : EMT = ± 3°C **réfrigérateur** : 5°C et EMT = ± 4°C **congélateur** : ≤ -18°C **congélateur froid intense** : ≤ -65°C
Longueur	EMT = ± 10%
Temps	EMT = ± 10%

OBLIGATIONS REGLEMENTAIRES ET LIMITES DE RESPONSABILITE

La mise en œuvre des méthodes officielles s'applique sans préjudice des réglementations françaises et communautaires ou des exigences normatives auxquelles doivent se soumettre les laboratoires (circulation, détention, manipulation des organismes nuisibles, détention des substances réglementées, bonnes pratiques de laboratoire, santé et sécurité au travail, mesures de confinement, agrément des laboratoires, déclaration à la commission de génie génétique …).
Dans un certain nombre de cas, les méthodes peuvent appeler l'attention des lecteurs sur des risques potentiels liés par exemple à la dangerosité de certains produits ou à la rupture du confinement. Ces mises en garde ne sont destinées qu'à aider les lecteurs et n'ont vocation ni à être exhaustives, ni à se substituer aux exigences réglementaires existantes.
Toute personne physique ou morale constatant la présence, sur un végétal, une partie de végétal ou un produit d'origine végétale, d'un organisme nuisible réglementé a l'obligation d'en faire déclaration auprès des services régionaux de l'alimentation des directions régionales de l'agriculture, de l'alimentation et de la forêt.

Les conditions de mise en œuvre des méthodes officielles ainsi que la qualité des réactifs-clé utilisés sont susceptibles de modifier la qualité des résultats obtenus avec les méthodes officielles. Ces deux derniers aspects relèvent de la responsabilité des laboratoires utilisateurs.

Le ministère chargé de l'agriculture ne saurait être tenu pour responsable dans le cas de mises en œuvre inadéquates, volontaires ou non des méthodes officielles.

REVUE DES METHODES OFFICIELLES, AMENDEMENT ET MODIFICATION

Une consultation publique est organisée en tant que de besoin avant la publication des méthodes officielles. Le document de travail est mis à disposition sur le site du ministère en charge de l'agriculture pendant une période de deux mois, au cours de laquelle les visiteurs sont invités à faire connaître leurs remarques, commentaires et suggestion et à signaler toute erreur, omission ou imprécision.

Les méthodes officielles sont par ailleurs revues périodiquement à l'initiative du ministère chargé de l'agriculture ou du laboratoire national de référence. A chaque modification, le code de la méthode change comme indiqué au chapitre « principales modifications par rapport à la version précédente ».
Les usagers sont également invités à faire connaître dans les meilleurs délais leurs remarques, commentaires et suggestions, et à signaler toute erreur, omission ou imprécision constatées.

ORIGINE DE LA METHODE

La présente méthode a été élaborée par la station d'Angers du LNPV avec l'aide de la station de quarantaine de Clermont-Ferrand et de la station de la Réunion.
Le travail de relecture et de révision a été effectué par le pôle « Développement de méthodes et analyses » du LNPV.

PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE

Une modification concerne des parties clé ou le fond même de la méthode officielle, dont la prise en compte est susceptible d'améliorer significativement la portée ou le résultat de la méthode d'analyse. Sa prise en compte peut nécessiter des adaptations importantes, c'est pourquoi un délai est en règle générale accordé pour que les laboratoires de référence, agréés ou officiellement reconnus *l'intègrent dans leur processus d'analyses.* Dans certains cas, clairement précisés, une modification peut nécessiter une prise en compte immédiate par les laboratoires. En cas de modification majeure, le numéro de version est incrémenté d'une unité (exemple: le version v1c devient v2a). La méthode ainsi modifiée est considérée comme une nouvelle méthode.

Une amélioration est une modification mineure, qui apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. En cas d'amélioration, le numéro de version reste le même mais la lettre associée est incrémentée (exemple: la version v1c devient v1d). La méthode ainsi améliorée n'est pas considérée comme une nouvelle méthode.

Les modifications et améliorations s'entendent par rapport à l'ancienne méthode officielle DG01/98b :

MODIFICATIONS

- modification des modalités de contrôle et de validation internes des lots d'*antisera* utilisés.
- apport de flexibilité quant à l'utilisation possible des puits de bordure si le laboratoire est en mesure de prouver l'absence d' « effet bordure » pour les échantillons ;

AMELIORATIONS

- mise en forme de la méthode et modification du préambule selon un schéma harmonisé commun à l'ensemble des nouvelles méthodes ;
- apport de précisions et compléments sur le mode opératoire ;
- retrait des définitions de ce document pour les intégrer dans un glossaire général ;
- remplacement du terme « D.O. » (densité optique) par Absorbance (A).

Nota bene: les améliorations de pure forme (y compris les corrections grammaticales ou orthographiques) ne sont pas reprises dans cette synthèse des modifications.

DESCRIPTION DE LA METHODE

1. Objet.

La présente méthode fixe les principes généraux de réalisation des analyses de dépistage ou d'identification des organismes nuisibles pour les végétaux à l'aide de la technique ELISA.
Les méthodes officielles par matrice et organisme pathogène ou, à défaut, les fournisseurs de réactifs sérologiques, fixent les exigences spécifiques complémentaires à mettre en œuvre pour la réalisation pratique des analyses, notamment :

- la nature et la préparation de l'échantillon pour analyse,
- la nature et la réalisation de la prise d'analyse,

et, pour le mode opératoire :

- l'extraction des antigènes (fragmentation, broyage, macération, ...),
- les modes de conservation du matériel végétal et de l'extrait.

Des consignes particulières peuvent également fixer les conditions ou éléments pouvant influer sur la qualité des résultats :

- l'ambiance générale des locaux (température, propreté, …),
- le "savoir faire" (pipetage, manipulation des plaques de microtitration, méthode de lavage lorsque celle-ci est manuelle,…),
- les seuils de détection.

Dans tous les cas, en cas de prescriptions techniques différant entre sources, il est demandé aux laboratoires d'appliquer, par ordre de priorité : les méthodes officielles spécifiques, les méthodes officielles générales ou, en l'absence d'autres éléments, les prescriptions des fournisseurs. En cas de doute, le laboratoire peut toujours solliciter l'avis du laboratoire national de référence correspondant à la ligne d'analyse concernée.

2. Domaine d'application.

Objets susceptibles d'être soumis à analyse.

Toutes les analyses de dépistage des organismes pathogènes pour les végétaux faisant appel à la technique ELISA ou ses dérivées sont concernées par la présente méthode.

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse

Les particularités des objets soumis à essais (nature, stade physiologique,…) et la taille des échantillons sont définies dans les notes de services publiées par le ministère chargé de l'agriculture ou dans les méthodes officielles spécifiques. Les spécifications techniques relatives à l'analyse proprement dite sont précisées dans les méthodes officielles par matrice/hôte pathogène.

Grandeur de l'objet soumis à analyse.

Les objets soumis à analyse (matrices, quantités,…) sont définis dans les méthodes officielles spécifiques des couples hôtes / organismes nuisibles.

Précaution(s) particulière(s) à prendre.

Les délais maximum entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse sont définies dans les méthodes officielles spécifiques voire dans les notes de services publiées par le ministère chargé de l'agriculture.

La température et autre conditions de conservation des échantillons sont définies dans les méthodes officielles spécifiques voire dans les notes de services publiées par le ministère chargé de l'agriculture.

3. Présentation schématique de la détection

La présente méthode rappelle quelques exigences générales concernant les réactifs et les consommables, le matériel, les contrôles et témoins. Elle présente ensuite les prescriptions techniques à respecter et appelle l'attention des utilisateurs sur quelques points clé pour chacune des étapes constitutives de l'ELISA.

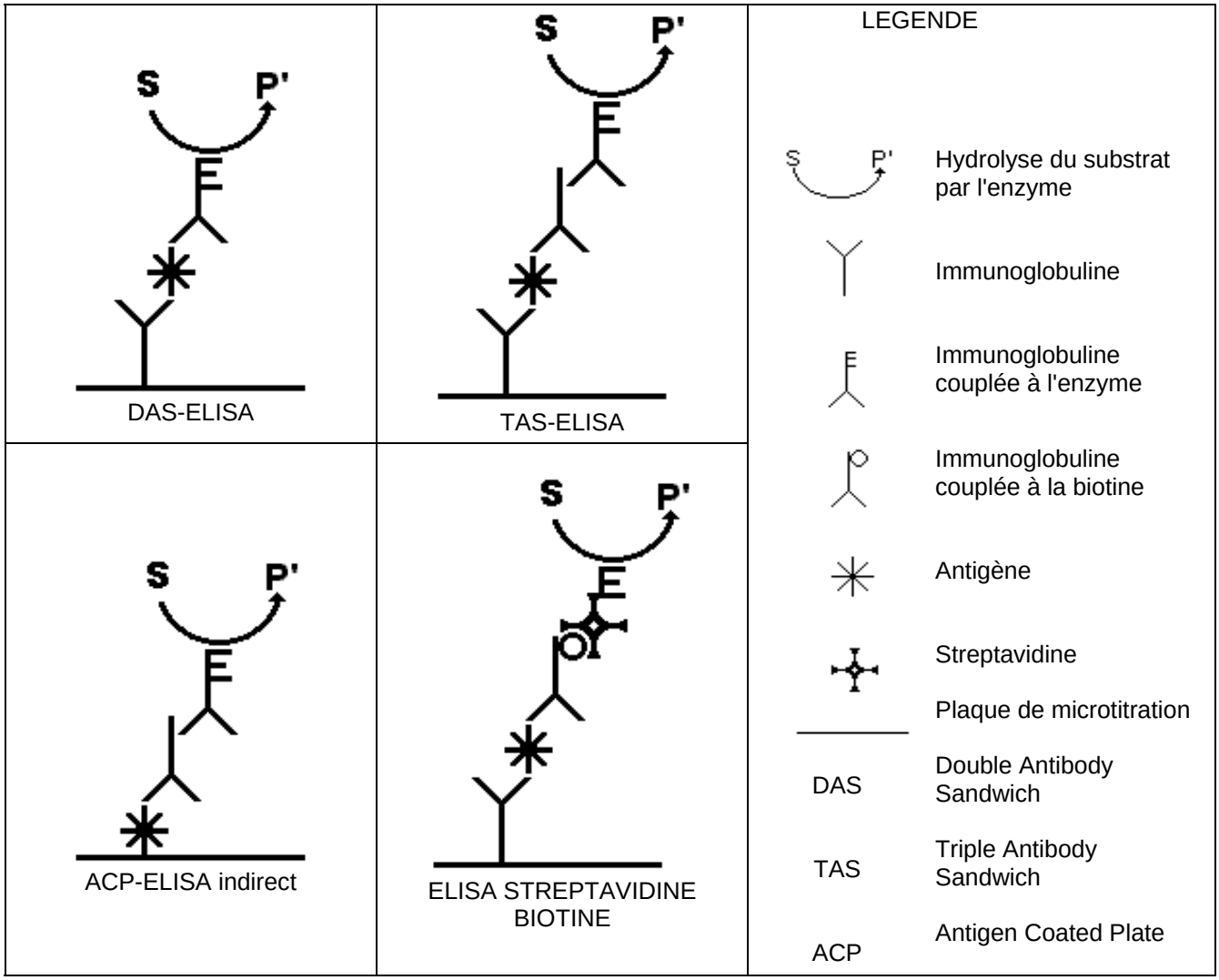
Les techniques immuno-enzymatiques utilisent le principe d'une réaction immunologique, suivie d'une réaction enzymatique de dégradation d'un substrat. Au cours de cette réaction, un anticorps (immunoglobuline Ig) reconnaît spécifiquement un antigène (Ag) et s'y fixe. Les immunoglobulines sont purifiées à partir du sérum d'un animal préalablement immunisé contre cet antigène ou à partir d'une culture cellulaire. Des anticorps recombinants du type Fab (Fragment antibinding) ou SCFV (Single Chain Fragment Variable) peuvent être utilisés.

Les méthodes de référence concernées font appel à des constructions diverses basées sur la réaction "anticorps - antigène" dont la plus fréquente est la DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Cette réaction est basée sur la reconnaissance spécifique de l'antigène par des anticorps adsorbés sur un support solide. L'antigène ainsi retenu est ensuite reconnu par un anticorps couplé à un marqueur enzymatique. Après addition d'un substrat spécifique de l'enzyme, la production d'un hydrolysat chromogène est révélateur de la présence de l'antigène recherché. L'absorbance du milieu réactionnel, mesurée par spectrophotométrie, est d'autant plus élevée que la concentration en hydrolysat est importante.

Des variantes de cette méthode existent :

- adsorption directe des antigènes sur les plaques (ACP) ;
- nécessité d'utiliser un anticorps supplémentaire (TAS), (cf. schéma ci-dessous) ;
- méthodes compétitives…

Schéma : les constructions les plus souvent utilisées en phytopathologie sont des méthodes non compétitives basées sur les principes suivants :



4. Produits et consommables

En règle générale, le manipulateur doit veiller à l'absence dans l'eau, produits et consommables utilisés, de contamination, d'inhibiteur ou de tout autre élément pouvant interférer sur le résultat par l'utilisation de produits et consommables certifiés, nettoyage, stérilisation ou tout autre traitement approprié.
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 jugera les plus optimales.

4.1. Les *antisera*

4.1.1. Choix du fournisseur par le laboratoire utilisateur

Les *antisera* sont des réactifs critiques dans les analyses ELISA. Lorsque l'information est disponible, le responsable technique choisit le fournisseur en fonction :

- des critères de performance des réactifs eux-mêmes ou de la capacité des réactifs à atteindre les critères de performance de la méthode officielle (ex : sensibilité et spécificité) lorsqu'ils sont précisés ;

- de la capacité du fournisseur à donner des informations concernant l'identification, le stockage, le mode d'emploi et les contrôles qualité internes de ses réactifs.

Conservation : respecter les préconisations du fabricant.

4.1.2. Contrôles effectués par le laboratoire utilisateur

Le laboratoire doit disposer d'une procédure de contrôle des *antisera*. Ce contrôle pourra être réalisé avant l'utilisation effective des produits ou parallèlement à leur première utilisation.

CRITERES
Le laboratoire utilisateur doit procéder au contrôle de la qualité des *antisera* en tant que réactif critique lorsqu'il utilise : a) un nouvel *antiserum* (*antiserum* différent de celui qu'il utilisait jusqu'alors) ou un *antiserum* différent de celui préconisé dans la méthode officielle. (ou une annexe de la méthode officielle) ; b) un nouveau lot de fabrication d'*antiserum*, NB : dans tous les cas, il est fortement conseillé de tester des échantillons sains et contaminés d'espèces végétales différentes, pour les différents organismes nuisibles parasites. a) Pour vérifier (en tant qu'utilisateur) la qualité d'un *antiserum* nouveau ou différent de celui préconisé dans la méthode officielle, 2 méthodes sont possibles : i) réaliser les analyses en utilisant des témoins de référence positifs et négatifs, si possible du matériel végétal infecté (TM) et non infecté (TS), traités selon les prescriptions de la méthode officielle ; dans ce cas, il convient de réaliser *a minima* l'évaluation sur : - 7 échantillons contenant la cible (échantillons naturellement ou artificiellement contaminés, souches en suspension,…) ; - 7 échantillons ne contenant pas la cible dont 3 sains et 4 contaminés avec des organismes non cibles (organismes proches génétiquement ou issus de la flore saprophyte de la même matrice) ; - 2 gammes de dilutions (5 dilutions par gamme) d'échantillons positifs afin d'évaluer le seuil de détection (absolu ou relatif[2]). ii) ou réaliser des analyses en comparant les résultats obtenus avec le nouvel *antiserum* et celui préconisé ou celui utilisé précédemment, en suivant les préconisations de la méthode officielle spécifique hôte/pathogène ou tout autre document officiel. Dans ce cas, le contrôle se fera, sauf impossibilité lié au volume d'analyses, *a minima* sur 10 échantillons de routine ou de statut connu (testés en double) et deux gammes de dilution du témoin positif fourni avec le kit. b) Lorsqu'il s'agit uniquement de vérifier la qualité d'un nouveau lot de fabrication d'un *antiserum* (même fournisseur) en tant qu'utilisateur, les tests peuvent se limiter à 3 échantillons (de routine ou de statut connu) et une gamme de dilution (5 dilutions) préparée à partir d'un échantillon de statut positif connu ou du témoin positif fourni avec le kit. Remarque : dans tous les cas, les gammes de dilutions testées devront encadrer le seuil de détection (des résultats positifs et négatifs doivent être obtenus). Le lot ou l'*antiserum* sont validés : a) pour les nouveaux *antisera* ou ceux différents de ceux préconisés par la méthode officielle, par le laboratoire national de référence, lorsque les critères de performance (sensibilité, spécificité, seuils de détection, …) attendus sont atteints. Pour cela, le laboratoire enverra ses résultats bruts d'absorbance au LNR. b) pour les nouveaux lots d'*antisera*, lorsque tous les résultats (statut des échantillons) obtenus entre le nouveau lot d'*antiserum* et le précédent sont concordants. Tout résultat discordant pourra, le cas échéant, donner lieu à une confirmation du statut de l'échantillon concerné par le LNR afin de déterminer si la discordance observée est erronée ou non.

[2] Exemple de seuil absolu : 10^3 ufc/mL ; seuil relatif : dilution au 1/5000è

4.2. Tampons

Utiliser les tampons prescrits dans la méthode officielle, ou ceux prescrits par le fournisseur.
Suivre les prescriptions de la méthode d'analyse ou, à défaut[3], celle du fournisseur pour leur conservation.

Si les tampons sont fournis en même temps que les réactifs, l'utilisateur se conformera aux indications du fournisseur quant à leur utilisation et leur conservation. Dans le cas où ils sont fabriqués au laboratoire, l'utilisateur se reportera à la méthode officielle spécifique.

***Remarque pour l'utilisation** : la température de consigne pour les incubations est atteinte d'autant plus vite si les tampons sont préalablement portés à une température proche avant d'être distribués dans les plaques de microtitration.*

4.3. Plaques de microtitration

Pour le choix des plaques, suivre les préconisations des méthodes officielles spécifiques hôte/pathogène ou, celles du fournisseur.
Le stockage des plaques doit se faire selon les préconisations du fabriquant. A défaut, éviter le stockage en dehors des emballages d'origine ou près d'une source de chaleur.

4.4. Substrat de l'enzyme

Suivre les préconisations figurant dans la méthode officielle spécifique hôte(s)/pathogène(s) ou, celles du fournisseur de réactifs.

4.5. Autres consommables

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

5. Appareillage et matériel

Pour la mise en œuvre d'analyses sérologiques, le laboratoire disposera en particulier des matériels suivants :

5.1. Petit matériel :

- système de pipetage (pipettes monocanal et multicanaux avec cônes correspondants) garantissant l'absence de contamination entre les solutions pipetées ;
- distributeur (facultatif) ;
- petite verrerie et tubes à usage unique pour préparer les dilutions ;
- chambre humide ;
- pissette.

[3] Lorsque la méthode officielle donne des spécifications techniques particulières, le laboratoire est tenu de les appliquer quand bien même elles seraient légèrement différentes des préconisations des fournisseurs. En cas de doute, il est toujours possible de contacter le LNR à l'origine de la méthode.

5.2. Gros matériel :

- bec à gaz (facultatif) ;
- pH-mètre ;
- balance(s) ;
- agitateur de type Vortex® avec, éventuellement, support centrifuge pour plaques à microtitration ;
- réfrigérateur / chambre froide ;
- congélateur;
- incubateur de plaques de microtitration pouvant assurer le maintien d'une température choisie ;
- broyeur de tissus végétaux dont le fonctionnement permet d'assurer l'absence de contamination entre échantillons ;
- système de lavage des plaques de microtitration (NB : lavage manuel possible) ;
- lecteur de plaques de microtitration.

Note : les équipements de mesure (exemple : balances, pH-mètres, pipettes, lecteur de microplaques) ainsi que les équipements comportant un élément métrologique (exemple : incubateurs, réfrigérateurs, congélateurs) doivent être confirmés et satisfaire aux exigences métrologiques définies en préambule et/ou précisées dans les méthodes officielles spécifiques.

6. Contrôles et témoins (références de lecture)

Il est obligatoire d'intégrer des références de lecture sur chaque plaque de microtitration.

Ces références sont constituées des témoins sains (TS), des témoins malades (TM), des témoins tampons (Tp) et des témoins substrat (appelés également puits substrat).

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 plaques. Leur observation et/ou lecture et conformité à l'attendu est un préalable à l'interprétation des résultats obtenus sur les échantillons soumis à analyse. Le traitement de ces références doit se faire dans les mêmes conditions que les échantillons testés uniquement pour les témoins sains.

6.1. Référence de lecture de l'absorbance (puits substrat)

La référence de lecture d'absorbance correspond à la moyenne des absorbances mesurées des puits substrats (voir exemple ci-dessous). Cette mesure intègre les réactions colorées non enzymatiques (dégradation naturelle du substrat).
Cette valeur, soustraite de l'absorbance brute (*i.e.* mesurée par le lecteur de microplaques) des échantillons permet d'obtenir les valeurs d'absorbance corrigée(s).
Le laboratoire doit formaliser clairement le mode d'acquisition de cette valeur. Généralement, les puits substrat sont composés *a minima* de 6 puits de la colonne 1 de la plaque.

Exemple de réalisation des puits substrats :
Lors de la 1ère étape "dépôt des Ig" = dépôt d'eau, lors de la 2ème étape "dépôt des extraits" = dépôt d'eau, lors de la 3ème étape "dépôt des Ig-E" = dépôt d'eau, et lors de la 4ème étape "dépôt du substrat" = dépôt de substrat.

6.2. Contrôle positif (témoin malade : TM)

Le TM constitue un élément de validation des analyses effectuées sur une plaque. L'obtention d'un résultat positif permet de garantir le déroulement correct de la manipulation.
Pour chaque série d'analyses, on peut soit utiliser un témoin malade lyophilisé fourni avec le kit d'analyse ou à disposition au laboratoire, soit des témoins malades broyés ou non broyés conservés congelés ou lyophilisés. Les TM peuvent également être préparés à partir de macérats artificiellement contaminés au laboratoire ou de dilutions de souches pures dans le cas de la bactériologie.

Attention : dans le cas d'utilisation de témoins malades internes, une baisse de la charge en cible peut être observée dans le temps (ex : congélation). Par ailleurs, la laboratoire devra tenir compte du fait que la cible peut ne pas être répartie de manière homogène dans les échantillons.

Des mesures doivent être mises en œuvre afin d'éviter toute inter-contamination, lors de la préparation des témoins positifs : manipulation des échantillons et des témoins positifs séparés dans le temps et/ou dans l'espace.

Généralement, deux puits au minimum sont réservés pour le TM.

QUALITES REQUISES POUR LE TM
. présence de l'antigène recherché en concentration suffisante pour donner un signal positif net ; . si possible, phase d'extraction des antigènes réalisée dans les mêmes conditions que les prises d'essai (non obligatoire).

Exemple de réalisation des puits TM :
Lors de la 1ère étape "dépôt des Ig" = dépôt des Ig (coating), lors de 2ème étape "dépôt des extraits" = dépôt du TM, lors de la 3ème étape "dépôt des Ig-E" = dépôt des Ig-E (conjugué), et lors de la 4ème étape "dépôt du substrat" = dépôt du substrat.

6.3. Contrôle négatif (témoin sain : TS)

Un extrait de végétal sain est utilisé comme témoin négatif. La moyenne des absorbances des témoins sains servira à déterminer le seuil de positivité.

Un nombre minimal de valeurs "non infectées" est nécessaire au calcul pour les formules intégrant l'écart type ; 6 est un nombre généralement admis (3 prélèvements, 2 puits de chaque). Lorsque les seuils ne sont pas déterminés en intégrant l' écart-type, le nombre minimal est de 4 (2 prélèvement, 2 puits de chaque) (cf. 8.2.1. Critères d'interprétation des lectures : détermination de seuils).

Le TS peut mettre en évidence les éventuelles réactions immunologiques non-spécifiques appelées « réactions croisées » de l'antigène recherché avec le végétal (bruit de fond) ou un éventuel dysfonctionnement lors de la manipulation (problèmes liés aux tampons, à l'*antiserum*…).

QUALITES REQUISES POUR LE TS
. absence de l'antigène recherché, . phase d'extraction des antigènes réalisée dans les mêmes conditions que les prises d'essai, si possible . matériel végétal si possible de même espèce (ou en cas d'impossibilité même genre ou même famille), du même organe et du même stade physiologique que les prises d'essai.

***Remarque** : dans certains modes de calcul des seuils (non détaillés), des échantillons déterminés comme non contaminés peuvent être intégrés aux TS pour l'analyse des résultats.*

Exemple de réalisation des puits TS :
Lors de la 1ère étape "dépôt des Ig" = dépôt des Ig (coating), lors de la 2ème étape "dépôt des extraits" = dépôt du TS, lors de la 3ème étape "dépôt des Ig-E" = dépôt des Ig-E (conjugué), et lors de la 4ème étape "dépôt du substrat" = dépôt du substrat.

6.4. Référence tampon d'extraction (Tp)

Le tampon d'extraction est la solution d'extraction des agents pathogènes.
La référence tampon d'extraction met en lumière d'éventuelles réactions enzymatiques non spécifiques liées à la manipulation (résidus de conjugué dans les cupules, ...).
Comme une référence non infectée, elle constitue un élément de validation des valeurs d'absorbance obtenues sur une plaque en donnant l'assurance d'un déroulement correct de la manipulation permettant une réaction négative.
Généralement, deux puits sont réservés pour les Tp.

Exemple de réalisation des puits tampons :
Lors de la 1ère étape "dépôt des Ig" = dépôt d'Ig (coating), lors de la 2ème étape "dépôt des extraits" = dépôt du Tp extraction , lors de la 3ème étape "dépôt des Ig-E" = dépôt des Ig-E (conjugué), et lors de la 4ème étape "dépôt du substrat" = dépôt du substrat.

7. Etapes de l'analyse

7.1. Plan de plaque

Établir soigneusement le plan de distribution (plan de plaque) et d'identification des extraits (voir exemple en annexe 1). Il est souhaitable d'adopter un plan standard au niveau du laboratoire.
Chaque échantillon est au moins répété ou dupliqué 1 fois soit 2 cupules par échantillon. Pour les références de lecture se référer au point 6. Emploi et nature des références de lecture.

Pour les échantillons, il est recommandé de ne pas utiliser les puits de bordure, sauf si le laboratoire peut prouver l'absence d'effet bordure.

7.2. Dépôt des anticorps de capture (coating)

7.2.1. Dépôt

Diluer à la concentration préconisée par le fournisseur ou après titration, au moment de l'emploi, les anticorps dans le tampon approprié.

Homogénéiser (par exemple par agitation ou pipetages répétés) avant distribution dans les cupules.

Distribuer le volume préconisé de cette solution dans les cupules des plaques de microtitration selon le plan de plaque préalablement défini en utilisant une micropipette ou un distributeur.

Remarque : *veiller à déposer la solution au fond des cupules (sans toucher le fond), éviter de la faire couler le long des parois ou sur le bord supérieur et, d'une manière générale, éviter de contaminer tout support avec le marqueur enzymatique.*

7.2.2. Incubation

Placer les plaques de microtitration en incubation selon les préconisations figurant dans la méthode officielle spécifique hôte/pathogène ou, celles du fournisseur de l'*antiserum*.

Remarques générales : *il est conseillé de ne pas empiler un nombre trop important de plaques pour maintenir des conditions de température homogènes entre les différentes plaques.*

Un dispositif efficace doit être mis en oeuvre pour éviter l'évaporation dans les cupules lors des différentes phases d'incubation. Pour limiter ce phénomène :

i) soit utiliser un système de couverture étanche (film plastique autocollant par exemple),
ii) soit disposer les plaques dans une chambre humide (exemple : boîte avec du papier absorbant humide).

Réaliser un tour d'eau sur les plaques (voir plan de plaque) permet également de limiter l'évaporation. Ce tour d'eau doit être réalisé sauf si le système de couverture utilisé est étanche et que le laboratoire peut prouver qu'il n'y a pas d'effet de bordures (écarts d'absorbance non significatifs par rapport à des puits non situés en bordure).

Respecter les durées et températures indiquées dans la méthode officielle spécifique hôte/pathogène, ou à défaut celles du fournisseur de réactifs.

7.2.3. Lavage(s)

NB : *Utiliser le tampon de lavage approprié.*

L'objectif de cette opération est de faire disparaître de la cupule, après réaction, le maximum d'anticorps non fixés dans les puits. Respecter le nombre de lavages et les durées d'application du tampon de lavage indiquées dans la méthode officielle spécifique hôte/pathogène ou dans le mode opératoire du fournisseur de réactifs.

S'assurer que toute la surface des cupules est lavée.
Selon le dispositif retenu, faciliter le lavage en faisant disparaître d'éventuelles bulles au fond des cupules (pour se faire, tapoter efficacement les plaques sur du papier absorbant).
Ne pas laisser sécher les plaques et procéder rapidement à l'étape suivante. Si un délai est nécessaire, maintenir du tampon de lavage dans les cupules.

Déroulement des étapes de lavage (cas du lavage manuel) :
1. éliminer l'excès de l'*antiserum* en renversant la plaque au-dessus d'un évier.
2. remplir les cupules de tampon. Lors de cette étape, veiller à éviter les contaminations de cupule à cupule en procédant de manière à ce que les débordements de tampon de lavage se produisent vers des cupules déjà remplies de tampon et non vers des cupules vides. Vider ensuite énergiquement l'excès de liquide. Au besoin taper les plaques sur du papier absorbant afin d'éliminer au mieux le résidu de tampon de lavage.

3. faire plusieurs rinçages successifs à l'aide d'une pissette contenant du tampon approprié. Le nombre de lavages est défini dans les méthodes officielles, ou, à défaut, dans les préconisations fournisseurs.

Remarque spécifique : *les virus très stables (ex : tymovirus et, à un degré moindre, comovirus et tobamovirus) ou très concentrés dans la plante (ex : potexvirus), présentent un risque plus élevé de contamination de cupule à cupule. Les phénomènes de débordement ou de transfert de particules par contact direct avec les extrémités de certains laveurs en sont le plus souvent responsables. Un contrôle attentif doit être mené et des dispositions limitant ce risque devront être prises en cas de nécessité.*

Exemples : positionnement aléatoire de la répétition des extraits, intercaler des cupules de tampon d'extraction dans le sens du lavage, augmenter le nombre des lavages, utiliser des équipements limitant les risques de « transferts » de particules d'une cupule à l'autre, …

7.3. Dépôt des extraits

7.3.1. Dépôt

Homogénéiser (par exemple par agitation ou pipetages répétés) avant distribution dans les cupules.
Dans les cupules des plaques de microtitration, déposer le volume préconisé des extraits homogénéisés selon le plan de plaque préalablement défini en utilisant une micropipette et en changeant de cône entre chaque extrait.
Si besoin, mettre les plaques de microtitration en agitation quelques secondes. Puis mettre les plaques à incuber.

Remarques : *déposer la solution au fond des cupules (éviter de toucher le bord supérieur et le fond des cupules).*
Un volume suffisant d'échantillon doit être déposé afin de recouvrir le fond de la cupule (généralement 100 ou 200 µL).

7.3.2. Incubation

Placer les plaques de microtitration en incubation selon les préconisations figurant dans la méthode officielle spécifique hôte/pathogène, ou dans celle du fournisseur. Respecter les remarques générales définies précédemment.

7.3.3. Lavage(s)

Idem point 7.2.3.

Le lavage après incubation des extraits doit être tout particulièrement soigné ; s'assurer visuellement qu'il ne subsiste aucun débris végétal dans les cupules.

7.4. Dépôt des anticorps conjugués

7.4.1. Dépôt

Diluer les anticorps conjugués dans le tampon spécifique et à la concentration préconisée (par le fournisseur ou par la méthode spécifique hôte/pathogène) au moment de l'emploi.
Homogénéiser (par exemple par agitation ou pipetages répétés) avant distribution dans les cupules.
Distribuer le volume préconisé de cette solution dans les cupules des plaques de microtitration selon le plan de plaque préalablement défini en utilisant une micropipette ou un distributeur.

Remarque : *particulièrement pour les anticorps conjugués, veiller à déposer la solution au fond des cupules (sans toucher le fond), éviter de la faire couler le long des parois ou sur le bord supérieur et, d'une manière générale, éviter de contaminer tout support avec le marqueur enzymatique.*

7.4.2. Incubation

Placer les plaques de microtitration en incubation selon les préconisations figurant dans la méthode officielle spécifique hôte/pathogène ou dans celle du fournisseur. Respecter les remarques générales définies précédemment.

7.4.3. Lavage(s)

Idem point 7.2.3.

Le lavage après incubation des anticorps conjugués doit être tout particulièrement soigné afin d'éviter les reliquats d'enzyme dans les cupules.

7.5. Dépôt du substrat

7.5.1. Dépôt

Préparer le tampon substrat selon les préconisations figurant dans la méthode officielle spécifique hôte/pathogène ou dans celle du fournisseur.

Distribuer le volume préconisé dans les cupules des plaques de microtitration selon le plan de plaque préalablement défini en utilisant une micropipette ou un distributeur.

Déposer la solution au fond des cupules (éviter de toucher le bord supérieur et le fond des cupules).
Si besoin, mettre les plaques de microtitration en agitation quelques secondes.

Remarques : *Pour les tampons contenant de la diéthanolamine, le pNPP (para NitroPhenylPhosphate) est mis en solution extemporanément et homogénéisé à l'abri de la lumière (par exemple par agitation ou pipetages répétés) avant distribution dans les cupules.*

7.5.2. Incubation

Placer les plaques de microtitration en incubation selon les préconisations figurant dans la méthode officielle spécifique hôte/pathogène, ou dans celle du fournisseur. Respecter les remarques générales définies précédemment.

7.6. Autres étapes éventuelles complémentaires

Selon le schéma de construction figurant dans la méthode officielle spécifique hôte/pathogène, ou d'après les données du fournisseur de réactifs, des étapes supplémentaires peuvent venir compléter ou remplacer celles décrites ci-dessus. Des étapes peuvent également être supprimées.
En fonction de la technique immunoenzymatique, la chronologie des étapes peut être modifiée, comme par exemple pour les techniques ACP où l'antigène est déposé en premier. Afin de réduire « le bruit de fond » certains protocoles incluent une étape de blocage au lait écrémé ou à la BSA après l'étape de coating.

8. Résultats

8.1. Validation des résultats

***Remarque liminaire** : un examen visuel des plaques peut être effectué, notamment en ce qui concerne les témoins et les puits de bordure pour se faire une première idée de la validité de la plaque. Toutefois, cet examen n'est que purement indicatif, les résultats étant rendus exclusivement sur la base des absorbances obtenues par comparaison avec des seuils à déterminer à chaque manipulation sur la base des valeurs moyennes des TS.*

8.1.1. Lecture des plaques de microtitration

Le lecteur de microplaques doit être régulièrement vérifié et confirmé afin de satisfaire aux exigences de la méthode en terme d'exactitude des résultats de mesure.
Après une période d'incubation à la température préconisée (par la méthode officielle spécifique hôte/pathogène, ou par le fournisseur) et à l'abri de la lumière (si nécessaire) une ou plusieurs lectures sont effectuées au lecteur de microplaques à une longueur d'onde définie.
Il est bien entendu nécessaire de choisir un lecteur de microplaques équipé d'un filtre chromatique adapté à la mesure de l'absorbance du produit de la réaction enzymatique (voir tableau ci-dessous) :

Enzyme	Substrat	Longueur d'onde du FILTRE
Phosphatase Alcaline	. p-Nitrophényl Phosphate (pNPP)	405 nm
	. NBT/BCIP (produits type bluephos)	595 nm / 650 nm
Péroxydase	. Acide 2,2'-Azino-bis-(3-Ethylbenz-thiazoline-6-Sulfonique) (ABTS)	405 nm
	. o-Phénylènediamine (Forme basique ou forme HCl) (OPD)	450 nm / 492 nm
	. 3,3',5,5'-Tetraméthylbenzidine (forme basique ou forme HCl) (TMB)	370 nm / 650 nm
	. o-Dianisidine (3,3'- Diméthoxybenzidine)	405 nm
	. Acide 5-aminoSalicylique (5AS)	550 nm

Remarques :
Avant lecture, il est impératif de bien essuyer le dessous des cupules de la plaque afin d'enlever toute trace de condensation due à l'utilisation de la chambre humide et d'ôter toutes les bulles présentes dans les cupules. En effet la condensation présente sous les cupules et la présence de bulles d'air sont de nature à modifier l'absorbance
L'agitation des microplaques est conseillée au moins avant la première lecture.
La plupart des lecteurs de microplaques doit être mis sous tension un certain temps avant lecture (suivre les préconisations du constructeur).

8.1.2. Vérification de l'interprétabilité des résultats avant exploitation des valeurs d'absorbance

Un minimum d'observations préalables est nécessaire avant l'exploitation des valeurs d'absorbance
Les résultats peuvent être interprétés si aucun incident ou anomalie (cf. tableau ci-dessous) n'est constaté. Dans le cas contraire, selon la nature de ces incidents et compte tenu de son expérience, le responsable technique évalue la pertinence à interpréter tout ou partie des résultats.

CRITERES de validation des plaques avant exploitation des valeurs d'absorbance des prises d'essai
1 - Observation des absorbances des références : . les valeurs des références infectées ont atteint le niveau de réaction attendu escompté (absorbances élevées donnant un résultat clairement positif), . les valeurs des références non infectées ont atteint le niveau de réaction attendu escompté (absorbances basses donnant un résultat négatif), . les valeurs des références Tp ont atteint le niveau de réaction attendu escompté (absorbances basses donnant un résultat négatif), . les valeurs obtenues pour les références non infectées sont proches des valeurs de la référence tampon (NB : il peut arriver que la référence tampon soit supérieure au témoin sain bien qu'en général la situation inverse est observée). Remarque : la validation tient principalement compte de l'expérience propre de chaque laboratoire.
2 - Distribution des valeurs d'absorbance sur la plaque ne mettant pas en évidence un gradient d'absorbances laissant suspecter une contamination à partir des TM ou d'échantillons positifs.
3 - Aspects localisés : . absence de phénomène local, non identifiable, affectant une des répétitions de l'analyse (valeurs d'absorbance de deux répétitions d'un même échantillon présentant un écart important).

Avant de réaliser à nouveau l'analyse, la lecture doit être répétée.

Si toutefois une nouvelle analyse est envisagée par le responsable technique, il choisira :

- de reprendre les extraits (préalablement stockés à une température limitant sa dégradation),
- ou de refaire une nouvelle prise d'analyse sur le matériel végétal éventuellement conservé,
- ou bien de demander un nouvel échantillon pour le laboratoire.

8.2. Interprétation et formulation des résultats

8.2.1. Critères d'interprétation des lectures : détermination de seuils

Le seuil de positivité est déterminé à partir des valeurs d'absorbance des témoins sains. Ces seuils sont déterminés pour chacune des plaques de microtitration.

Les formules de calcul les plus couramment utilisées pour interpréter les résultats s'appuient sur 2 seuils, mais d'autres méthodes peuvent être utilisées si elles ont été éprouvées au sein du laboratoire[4]:

- Seuil 1 (séparant les négatifs des indéterminés) :
  - moyenne d'absorbance des échantillons non infectés additionnée de plusieurs fois leur écart type (2 en général),

  ou
  - moyenne des absorbances des TS multipliée par un facteur (A1).

- Seuil 2 (séparant les indéterminés des positifs) :
  - moyenne d'absorbance des échantillons non infectés additionnée de plusieurs fois leur écart type (4 en général),

  ou
  - moyenne des absorbances des TS multipliée par un facteur (A2 > A1).

[4] Notamment des méthodes statistiques basées sur des ANOVA (analyses de variances) par groupes d'échantillons

Il est également possible de choisir de n'utiliser qu'un seul seuil (absence d'indéterminés de fait), le seuil étant calculé avec la formule

Moy A TS + (t x Ecart Type)

avec t donné par le test de Student selon le nombre de valeurs de TS utilisées (donnant le degré de liberté) et le risque d'erreur accepté.

Sauf indication contraire dans une méthode spécifique, les calculs sont réalisés à partir des valeurs d'absorbance corrigées (cf. 6.1. Référence de lecture de l'absorbance).

NB : *certaines méthodes d'interprétation des résultats peuvent indifféremment être utilisées sur des absorbances brutes ou corrigées.*

La valeur d'absorbance retenue pour un échantillon, base de l'interprétation donc, correspond à la moyenne des valeurs d'absorbance de ses deux répétitions. Le responsable technique doit toutefois vérifier l'absence d'écart important entre les répétitions d'un même échantillon.

Remarque : l'observation répétée d'écarts de valeurs d'absorbance inter-puits significatifs pour une même répétition doit faire l'objet d'une analyse des causes de ces écarts, suivi de la mise en place d'actions correctives.

Le responsable technique doit se référer au mode de calcul préconisé dans la méthode officielle spécifique hôte/pathogène (lorsque cela est le cas) ou aux données fournisseur. Le recours à un mode de calcul différent peut-être envisagé dans certaines situations. Il doit alors être justifié et décrit dans une procédure du laboratoire. Dans ce cas, le laboratoire déterminant ses propres critères est tenu de vérifier :

- la sensibilité, la spécificité, le seuil de détection, la répétabilité et la reproductibilité de la méthode ;
- à chaque manipulation, que les absorbances des TS, de l'eau et des puits substrats donnent bien des valeurs d'absorbance correspondant à un résultat négatif.

L'atteinte des objectifs de performance des méthodes utilisées peut également être évaluée par le biais d'un essai inter-laboratoires.

***NB** : certaines méthodes de calcul ne sont pas adaptées pour des absorbances utilisées brutes, notamment celles faisant appel à un coefficient multiplicatif de la moyenne élevé.*

La règle de décision retenue, et le seuil de détection qui en découle, influencent directement la sensibilité et la spécificité de la méthode.

Remarques :

- L'exploitation dans une formule de valeurs très faibles pour les témoins sains, par exemple absorbance corrigée < 0,010 doit être prudente pour au moins deux raisons :

- *les valeurs extrêmes ne se situent pas dans la zone de proportionnalité : concentration en substance absorbante / valeur d'absorbance et une variation importante peut être observée sans signification quant à l'état d'infection, par exemple : deux absorbances corrigées de 0,007 et 0,018 sont équivalentes dans le contexte considéré,*
- *l'intégration dans un calcul de valeurs très faibles, voire nulles, peut paraître aberrante.*

Dans ce cas, un seuil de positivité, donné en valeur corrigée par exemple 0,100 peut se substituer au seuil basé sur la moyenne des absorbances des témoins sains ;
Par ailleurs, lorsque les absorbances corrigées obtenues sont négatives (absorbance des puits substrat légèrement supérieure à celle des TS), il est possible pour ne pas avoir à considérer la valeur nulle de prendre la valeur absolue. Cette possibilité n'est laissée que dans les cas où la valeur absolue ne dépasse pas 0,010.

- Un nombre minimal de valeurs "non infectées" est nécessaire au calcul pour les formules intégrant l'écart type ; 6 est un nombre généralement admis. Pour les autres cas, le nombre minimal est de 4.
- Une appréciation visuelle de la coloration par le responsable technique, compte tenu de son expérience, est considérée comme une manière de procéder qui relève de la spontanéité, mais qui ne peut suffire en termes de reproductibilité et de traçabilité.

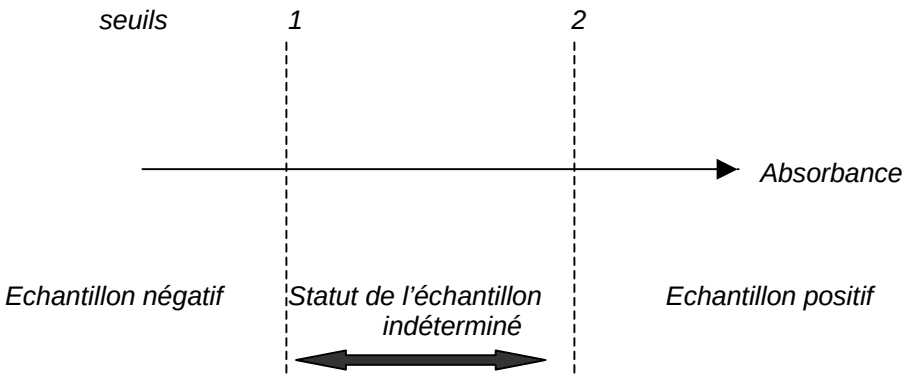
- Lorsque les TS présentent des absorbances élevées, l'utilisation de seuils faisant appel à des coefficients multiplicateurs de cette moyenne d'absorbances peut donner lieu à des résultats faussement négatifs. L'obtention de résultats élevés d'absorbances pour les TS doit donner lieu à une interprétation avec prudence.

8.2.2. Détermination et formulation du résultat d'analyse

La méthode officielle spécifique hôte/pathogène employée peut être très sensible et notamment capable de détecter de très faibles quantités de l'antigène recherché, et/ou elle peut être "spécifique" et sera alors apte à éliminer toutes confusions entre l'antigène recherché et un antigène sérologiquement proche.
Toutefois, même optimisée, une méthode d'analyse ne garantit pas toujours un pouvoir discriminant absolu et des "faux négatifs" peuvent être engendrés si la technique n'est pas assez sensible, ou des "faux positifs" si la technique n'est pas assez spécifique.
L'un ou l'autre de ces risques peut être accepté dans certains cas, par exemple, pour satisfaire à la volonté de garantir l'absence d'un agent pathogène, on accepte le risque "faux positif". Néanmoins, il y a intérêt à pouvoir identifier au mieux les échantillons situés dans la zone intermédiaire entre "négatifs" et "positifs". Pour les qualifier, le vocable "indéterminé" est à utiliser. Le terme « douteux » est à proscrire.
Selon le contexte, la méthode officielle spécifique hôte/pathogène peut préciser la conduite à tenir face à ces difficultés d'interprétation et le recours éventuel à d'autres techniques d'analyse.

Dans tous les cas, en cas de résultat indéterminé lors d'une analyse, il est souhaitable de refaire une analyse, selon les cas à partir du même extrait, d'une nouvelle prise d'essai ou d'un nouvel échantillon.

Prise de décision



A titre d'exemple :

1 Echantillon négatif : Moy A < Moy A TS + (2 x EcartType)

2 Statut de l'échantillon indéterminé : Moy A TS + (2 x EcartType) ≤Moy A < Moy A TS + (4 x EcartType)

3 Echantillon positif : Moy A ≥ Moy A TS + (4 x EcartType)

9. Elimination des matériels susceptibles d'être contaminants

Le laboratoire doit mettre en œuvre des mesures prenant en compte les risques liés aux matériels susceptibles d'être contaminants pour garantir la non dissémination de l'organisme nuisible dans l'environnement.

10. Conservation des reliquats de matériels utilisés

Sauf mention contraire explicite ou impossibilité technique avérée, les laboratoires doivent conserver les reliquats pertinents (nature, quantité et qualité) de matériel soumis à analyse, dans des conditions appropriées garantissant leur intégrité, jusqu'à au moins le dixième jour ouvrable suivant l'envoi au demandeur d'un rapport d'analyse concluant à la non mise en évidence de l'organisme recherché. 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.

Dans le cas d'un résultat autre que la non mise en évidence de l'organisme recherché, et sauf indications plus précises dans la méthode, l'ensemble des reliquats pertinents doit être conservé pendant une durée minimale de 12 mois, sauf pour les parties éventuellement transmises à un autre laboratoire agréé ou de référence, à qui est alors transférée la charge de conservation des reliquats. Le laboratoire national de référence peut demander que tout ou partie de ces reliquats lui soient transmis, aux frais des laboratoires agréés ou reconnus, dans le cadre des missions qui lui sont confiées.

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE

Référence	Titre
GLO 001	Glossaire des termes techniques en vigueur au LNPV
REP 001	Répertoire des recettes en vigueur au LNPV

REMERCIEMENTS

Le laboratoire national de la protection des végétaux remercie pour leur relecture et leurs commentaires sur la présente méthode le LDA13 et le LDA22- LCA.

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE

Norme 47 - 019 : Guide de bonnes pratiques pour la mise en œuvre des techniques ELISA

Norme NF U47-302 (octobre 2002). Protocole de contrôle des réactifs pour la recherche des anticorps dirigés contre le virus de la leucose bovine enzootique par la méthode ELISA dans des sérums (mélange ou individuels)

Pour toute demande à caractère scientifique et technique relative à ce document, le point de contact national désigné par le ministère chargé de l'agriculture est le laboratoire national de référence concerné :

Laboratoire national de la protection des végétaux,
7 rue Jean Dixméras, 49044 ANGERS cedex 01
lnpv.sdqpv.dgal@agriculture.gouv.fr

Ce document est édité par :

Ministère de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche
Direction générale de l'alimentation
Service de la prévention des risques sanitaires de la production primaire
Sous-direction de la qualité et de la protection des végétaux
251 rue de Vaugirard, 75732 PARIS Cedex 15
www.agriculture.gouv.fr

auprès de qui toute autre correspondance peut être adressée.

ANNEXE I. EXEMPLE DE PLAN DE PLAQUE

Date :

PLAQUE N°: **Chargement effectué par :**

ANTIGENE(S) :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	**Eau**	**Eau**	**Eau**	**Eau**	**Eau**	**Eau**	**Eau**	**Eau**	**Eau**	**Eau**	**Eau**	**Eau**
B	**Subst**	**Ech. 1 rep A**	**...**	**...**		**TS**						**Eau**
C	**Subst**	**Ech.1 rep B**	**...**									**Eau**
D	**Subst**	**TS**	**...**								**Tp**	**Eau**
E	**Subst**	**TS**	**...**								**Tp**	**Eau**
F	**Subst**	**Ech.2 rep A**	**...**								**TM**	**Eau**
G	**Subst**	**Ech. 2 rep B**	**...**							**TS**	**TM**	**Eau**
H	**Eau**	**Eau**	**Eau**	**Eau**	**Eau**	**Eau**	**Eau**	**Eau**	**Eau**	**Eau**	**Eau**	**Eau**

OBSERVATIONS : ***Le "blanc" du lecteur de microplaques est réalisé sur la première colonne qui est chargée en solution substrat à la dernière étape (facultatif.)***
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 plaque est étanche et que le laboratoire peut prouver qu'il n'y a pas d'effet de bordure (cf. point 7.1).

ANNEXE II – TABLEAU DE CORRESPONDANCE

DG1/98/version b	MOA 008 version 1a
1. Introduction	PREAMBULE 1. Objet 2. Domaine d'application 3. Présentation schématique de la méthode
2. Définitions	Renvoi au glossaire GLO 001
3.Exigences supplémentaires	1. Objet 3. Présentation schématique de la méthode
3.1. Personnel	(voir les condition d'agrément des laboratoires)
3.2. Matériel	5. Appareillage et matériel
3.3. Les réactifs sérologiques	4. Produits et consommables 4.1. Les antisera
3.3.1. Choix du fournisseur par le laboratoire utilisateur	4.1.1. Choix du fournisseur par le laboratoire utilisateur
3.3.2. contrôle effectués par le laboratoire utilisateur	4.1.2. Contrôle effectués par le laboratoire utilisateur
3.4. Produits et consommables	4. Produits et consommables
3.4.1. Substrat de l'enzyme	4.4. Substrat de l'enzyme
3.4.2. Tampons	4.2. Tampons
3.4.3. Plaques de microtitration	4.3. Plaques de microtitration
3.4.4. Autres consommables	4.5. Autres consommables
3.5. Mode opératoire	7. Etapes de l'analyse
3.5.1. Emploi et nature des « échantillons de référence »	6. Contrôles et témoins (références de lecture)
3.5.2. Qualités requises pour les échantillons de référence	6. Contrôles et témoins (références de lecture)
3.5.3. Mise en œuvre des analyses	7. Étapes de l'analyse
3.5.4. Lecture et interprétation des absorbances	8. Résultats 8.1 Validation des résultats 8.1.1. Lecture des plaques de microtitration 8.1.2 Vérification de l'interprétabilité des résultats avant exploitation des valeurs d'absorbance 8.2 Interprétation et formulation des résultats 8.2.1. Critères d'interprétation des lectures : détermination de seuils
3.6. Détermination et formulation du résultat d'analyse	8.2.2. Détermination et formulation du résultat d'analyse
3.6.1. Précaution pour la détermination du résultat	8.2.2. Détermination et formulation du résultat d'analyse
3.6.2 Formulation	8.2.2. Détermination et formulation du résultat d'analyse