Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTERE DE L'AGRICULTURE, DE L'ALIMENTATION, DE LA PÊCHE,
DE LA RURALITÉ ET DE L'AMÉNAGEMENT DU TERRITOIRE

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/2010-11-018
MOD10.21 C 12/05/10

NOTE DE SERVICE

DGAL/SDQPV/N2010-8320

Date: 22/11/2010

Date de mise en application :	immédiate
Abroge et remplace :	Sans objet
Date d'expiration :	Sans objet
Date limite de réponse :	Sans objet
Nombre d'annexe :	1
Degré et période de confidentialité :	aucune

Objet : Méthode officielle d'analyse MOA 014 version 1a relative à la détection du Banana bunchy top virus (BBTV) sur feuilles de bananier par la technique sérologique ELISA

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 014 version 1a relative à la détection du Banana bunchy top virus (BBTV) sur feuilles de bananier par la technique sérologique ELISA

Mots-clés : Virologie - méthode officielle – analyses - détection - *Banana bunchy top virus* - bananier

Destinataires

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

Le Banana bunchy top virus (BBTV), organisme nuisible du genre Babuvirus de la famille des Nanoviridae, est l'agent responsable de la maladie du sommet buissonnant du bananier.

Décrit pour la première fois aux îles Fidji en 1889-1890, le BBTV est un virus encore limité dans sa distribution géographique (Asie essentiellement, Océanie et quelques pays africains), mais dont les conséquences sont très graves sur la production.

Des études récentes basées sur l'analyse de séquences génomiques laissent à penser qu'il existe deux populations distinctes de BBTV :

- les isolats d'Australie, d'Afrique, du Pacifique Sud et d'Inde (groupe Pacifique Sud)
- et les isolats de l'Asie du Sud-Est : Philippines, Taiwan et Viêt-nam (groupe Asie).

Les plants infectés par le BBTV présentent divers symptômes. Lorsque la maladie est avancée, ils prennent l'apparence d'une rosette, avec des feuilles étroites, dressées et progressivement de plus en plus courtes, d'où l'appellation de « bunchy top » (sommet touffu). On observe fréquemment, sur la nervure centrale et le pétiole, des stries vert foncé s'étendant jusqu'au pseudo-tronc. Les rejets d'un plant infecté montrent de sévères symptômes sur feuilles et ont un nanisme important.

La dissémination du BBTV se fait de deux façons : par pucerons (*Pentalonia nigronervosa* est la seule espèce d'insecte vecteur) et par le matériel végétal de plantation. Le virus n'est pas transmissible mécaniquement.

L'arrêté du 3 septembre 1990, complété par celui du 3 décembre 1991 (annexes DOM) précise l'inscription en annexe II (organisme dont l'introduction est interdite s'il se présente sur certains végétaux ou produits végétaux) du BBTV pour les Antilles, la Guyane et la Réunion sur bananier.

La méthode officielle de détection du Banana bunchy top virus sur feuilles de bananier, qui repose sur l'emploi de la technique sérologique ELISA, est donnée en annexe de la présente note.

L'ingénieur en Chef des ponts, des eaux et des forêts,
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

Détection du Banana bunchy top virus (BBTV) sur feuilles de bananier (*Musa* spp.) par la technique sérologique ELISA.

Réf. : MOA 014 version 1 a

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 des versions de la méthode.

MOA 014	Consultation publique		Validité	
Numéro de la version	Début	Fin	Début	Fin
MOA 014 version 1a	Septembre 2010	Novembre 2010	Novembre 2010	

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 ET REMERCIEMENTS **8**

PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE **9**

Modifications 9
Améliorations 9

DESCRIPTION DE LA METHODE **10**

1. Objet. 10
2. Domaine d'application. 10
3. Présentation schématique de la détection 12
4. Produits et consommables 12
   4.1. Réactifs sérologiques 13
   4.2. Tampons 13
   4.3. Autres consommables 13
5. Appareillage et matériel 14
6. Contrôles et témoins 14
7. Prise d'analyse 15
8. Etapes de l'analyse 15
   8.1. Broyage de l'échantillon 15
   8.2. Déroulement du test 16
9. Résultats 17
   9.1. Validation des résultats 17
   9.2. Interprétation des lectures : détermination des seuils 17
   9.3. Détermination et formulation du résultats d'analyse 17
10. Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants 18
11. Conservation des reliquats de matériels utilisés 18

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES.....**19**

PAR LA METHODE.....**19**

BIBLIOGRAPHIE.....**20**

ANNEXE 1-plan de plaques.....**20**

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.

ECHANTILLONNAGE 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 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, 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 des méthodes).

Volume	**volume < à 10 mL** : EMT = ± 10% **Volume ≥ à 10 mL** : EMT = ± 5 %
Masse	EMT = 10%
pH	EMT = 0,3 unité pH
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 ET REMERCIEMENTS

La présente méthode a été évaluée et rédigée par le laboratoire national de la protection des végétaux, Station « Ravageurs et Agents Pathogènes Tropicaux » (pôle 3P, 7 chemin de l'IRAT, 97410 Saint-Pierre).

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.

MODIFICATIONS

Sans objet (première version publiée).

AMELIORATIONS

Sans objet (première version publiée).

DESCRIPTION DE LA METHODE

Détection du Banana bunchy top virus sur feuilles de bananier
par la technique sérologique ELISA

Introduction : Contexte réglementaire

Le banana bunchy top virus (BBTV) est un organisme nuisible**,** agent responsable de la maladie du sommet buissonnant du bananier, maladie virale des bananiers actuellement considérée comme une des plus graves.

L'introduction de ce virus est interdite pour les quatre départements d'outre mer (DOM), par l'arrêté du 3 septembre 1990, complété par celui du 3 décembre 1991 (annexes DOM). Il s'agit également d'un organisme soumis à des mesures de lutte obligatoire pour les quatre DOM (arrêté du 31 juillet 2000).
L'entrée de matériel végétal de bananiers est interdite dans les DOM, toutefois, l'arrêté du 17 octobre 1995, autorise par dérogation l'importation de vitro-plants de bananiers, sous certaines conditions spécifiées par l'intermédiaire d'un cahier des charges, dont entre autres l'absence d'infection par le BBTV.

1. Objet

Les isolats du BBTV collectés dans différentes régions du monde sont sérologiquement étroitement apparentés, bien que des informations récentes basées sur l'analyse de séquences génomiques laissent à penser qu'il existe deux populations distinctes :
- les isolats d'Australie, d'Afrique, du Pacifique Sud et d'Inde (groupe Pacifique Sud) ;
- et les isolats de l'Asie du Sud-Est : Philippines, Taiwan et Viêt-nam (groupe Asie).

La méthode décrite ci-dessous permet de détecter la présence du BBTV par la technique sérologique ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).

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.
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.

***Remarque** : cette méthode est directement liée à la méthode officielle d'analyse MOA 008 «Techniques ELISA » : elle ne peut être appliquée qu'en respectant les préconisations de cette méthode officielle.*

2. Domaine d'application

Objets susceptibles d'être soumis à analyse

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

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse

Cas d'échantillons frais : les échantillons doivent arriver au laboratoire en bon état, propres, frais et sans signe de sénescence.
Cas d'échantillons déshydratés : les échantillons doivent être complètement déshydratés.
Dans les cas contraires, 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.

Grandeur de l'objet soumis à analyse

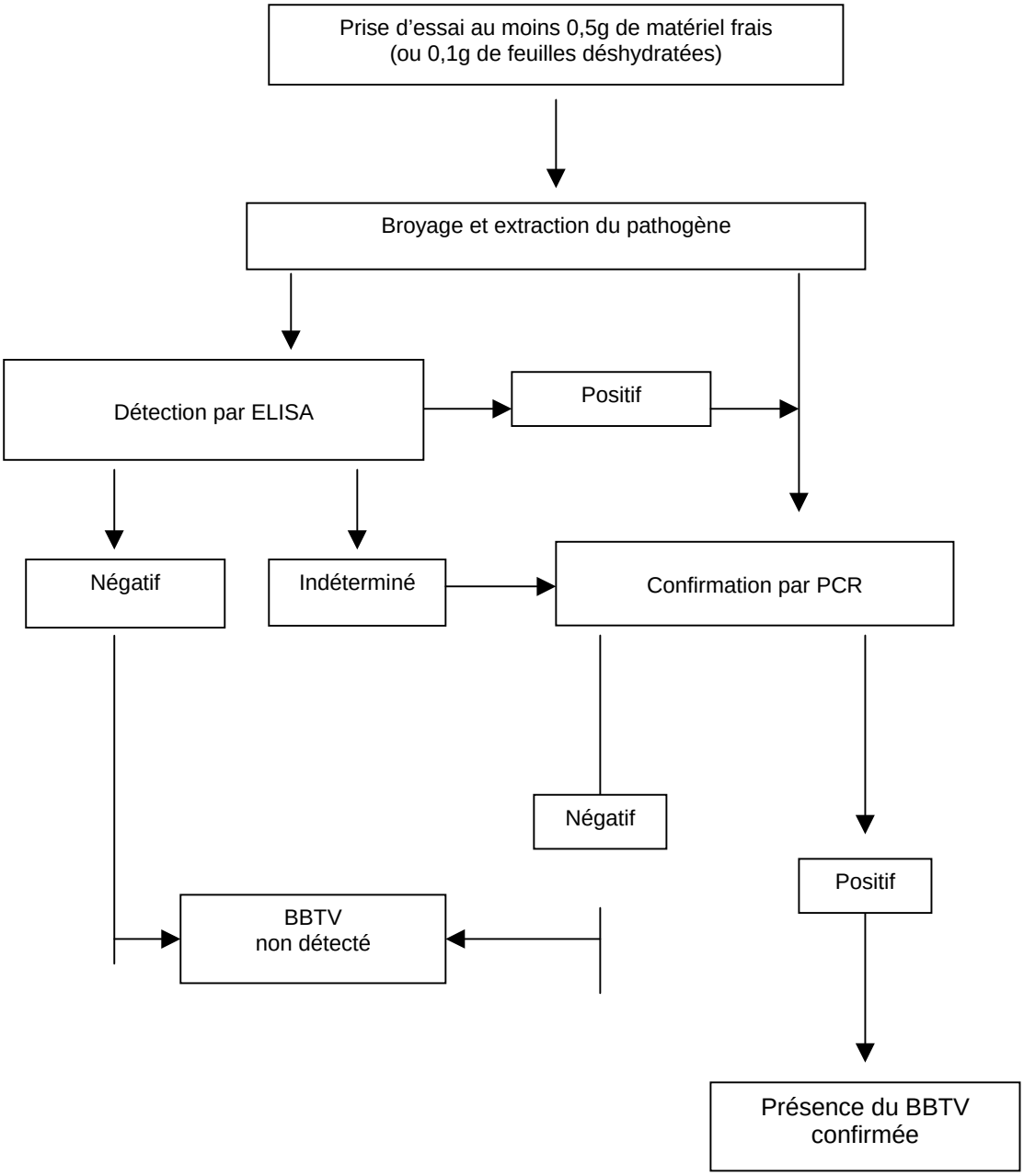
Pour le matériel frais, chaque prise d'essai est constituée au minimum de 0,5g de matériel végétal
Pour le matériel déshydraté (échantillons lyophilisés ou en BOS), la prise d'essai est constituée au minimum de 0,1g de feuille déshydratée.
En deçà de cette quantité de matériel végétal, des réserves sont émises quant au résultat d'analyse si ce dernier est négatif.

Précaution(s) particulière(s) à prendre

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 à –18°C, en attente de traitement (maximum 1 mois). La prise d'essai sera alors préférentiellement effectuée 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) ».

3. Présentation schématique de la détection



***Remarque** : Tout résultat indéterminé ou positif devra être confirmé (sauf mention contraire des services du ministère chargé de l'agriculture). Toutefois, il importe de préciser qu'un résultat négatif peut aussi donner lieu à confirmation si les services du ministère chargé de l'agriculture le jugent nécessaire.*

4. Produits et consommables

En règle générale, l'opérateur 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 jugera les plus optimales.

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

4.1. Réactifs sérologiques

Le laboratoire utilisera des réactifs spécifiques du BBTV.
Un conseil pour le choix du fournisseur de réactifs sérologiques peut être apporté par le laboratoire de référence ; il est donc recommandé de contacter ce laboratoire avant chaque campagne d'analyse. Dans tous les cas, le laboratoire ne pourra pas utiliser un réactif testé puis déclaré non satisfaisant par le laboratoire de référence.

4.2. 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 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. Pour cela, le laboratoire se référera au répertoire des recettes en vigueur au LNPV (REP-001). Par contre, les tampons d'extraction et de conjugué, qui sont spécifiques de l'antisérum utilisé, doivent impérativement et strictement 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.

4.3. Autres consommables

-Eau de qualité « analytique » (i.e. déminéralisée, distillée, osmosée,…) garantissant d'atteindre les critères de performance attendus pour les tests.

-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.

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

5. Appareillage et matériel

Pour la mise en œuvre de cette méthode, le laboratoire disposera des appareils décrits dans la méthode officielle d'analyse « Techniques ELISA » (MOA 008).

Différents systèmes de broyage peuvent être utilisés, en fonction de l'appareillage disponible au laboratoire. Toutes les méthodes sont valables à condition de mettre en œuvre les moyens qui permettent d'éviter les risques de contaminations croisées.
Nous recommandons l'utilisation d'un broyeur à bille, avec broyage de l'échantillon 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.

6. Contrôles et témoins

Il est obligatoire d'intégrer des références de lecture sur chaque plaque de microtitration. Conformément aux exigences de la méthode officielle d'analyse « Techniques ELISA » (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.
Si possible, traiter les témoins sains avant les témoins malades. 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* pp) 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 nettement en dessous des valeurs de saturation lors de la lecture de référence.
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.
Ce témoin est choisi par le laboratoire parmi les échantillons ayant fourni, lors d'études préalables, des résultats suffisamment constants et proches du seuil de positivité. 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).
La première 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. Elle 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. Leur observation et/ou lecture et conformité à l'attendu sont un préalable à l'interprétation des résultats obtenus sur les échantillons soumis à analyse.

7. Prise d'analyse

Le BBTV est préférentiellement localisé dans les tissus du phloème des plants infectés, où il induit une désorganisation (nombre anormal de chloroplastes dans les cellules entourant le phloème) à l'origine du symptôme de stries vert-foncé.
Le BBTV se réplique durant une courte période au point d'inoculation du puceron, il descend ensuite dans le pseudo-tronc vers le méristème basal, et finalement vers le bulbe, les racines et les feuilles nouvellement formées. La réplication n'a pas été démontrée dans les feuilles formées avant l'infection (*Hafner G.J. et al., 1995*).
Divers auteurs rapportent que la distribution du BBTV au sein du bananier permet une détection du pathogène aussi bien sur feuilles (limbe et nervure centrale) que sur pétioles, pseudo-tronc, racines, rhizome et méristème. Toutefois, selon *Wu et al.(1992*), les plants infectés contiennent les plus fortes concentrations de BBTV dans les feuilles (limbe et nervure centrale), pétioles et gaines de la seconde feuille en partant du sommet. Par contre, ils n'ont pu détecter par ELISA le BBTV (absent ou présent en trop faibles concentrations) dans les rhizomes, racines, et les gaines des feuilles plus âgées ne présentant pas de symptôme.
Selon *Thomas et al*. (1991), les valeurs d'absorbance en ELISA sont plus élevées sur extraits provenant de la nervure centrale (1, 3 à 4,6 fois plus) que sur extraits provenant du limbe foliaire.
Il est donc préférable de réaliser la prise d'essai sur feuilles jeunes (trois dernières feuilles complètement déployées) en incluant une partie de la nervure centrale.
La détection du CMV et du BBTV sur matériel végétal peut se faire à partir de la même prise d'essai.

Dans le cas où il y a des symptômes de nature à suspecter le BBTV (stries vert-foncé sur les nervures secondaires avec un faciès en crochet au niveau de la nervure principale, particulièrement visibles lorsqu'on regarde la feuille par dessous, en la plaçant à contre-jour), la prise d'essai sera faite préférentiellement dans ces zones, toujours en essayant d'inclure une partie de la nervure centrale.

Chaque prise d'essai est constituée au minimum de 0,5g de feuilles fraîches (ou 0,1g de feuilles déshydratées).

Pour les prises d'essai sur feuilles, comme sur autres matrices, l'opérateur veillera à prélever les tissus les mieux conservés (absence de signe de sénescence). Il 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'opérateur veillera à désinfecter le matériel utilisé pour les prélèvements.

Il peut être intéressant de préparer le même échantillon 2 fois dans l'éventualité d'une répétition du test (pour une confirmation par exemple).

***Remarque** : les résultats du dossier de validation ne permettent pas de proposer un regroupement d'échantillons pour la détection du BBTV par ELISA.*

8. Etapes de l'analyse

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

8.1. Broyage de l'échantillon

Broyer le matériel végétal dans le tampon de broyage préconisé par le fournisseur de réactifs sérologiques et selon le ratio poids/volume préconisé par le fournisseur (généralement 1/10 soit 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 feuilles déshydratées, le ratio préconisé est de 0,1g de matériel déshydraté pour 4,5 mL de tampon.

La séquence de broyage doit se terminer par le broyage des témoins malades.

Les broyats obtenus doivent être conservés à +5°C et utilisés le plus rapidement possible (au plus tard dans la journée). Après dépôt, les extraits sont congelés et conservés à une température inférieure à –18°C dans l'attente d'un résultat définitif. Ils pourront servir à une éventuelle confirmation.

8.2. Déroulement du test

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, à titre indicatif, le choix des paramètres peut être le suivant :

Coating (Immunoglobulines IgG) : au moment de l'emploi, les IgG sont diluées puis homogénéisées dans du tampon coating. Remplir les puits des microplaques à raison de 100µL / puits.
Incuber à + 37°C ou à température ambiante, durée à fixer comprise entre 2 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 de 2 à 4 minutes avant de vider.

Dépôt des extraits : remplir les puits à raison de 100µL / puits avec les extraits de plante.
Incuber à température ambiante pendant 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 de 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 puis homogénéisées dans du tampon conjugué. Remplir les puits à raison de 100µL / puits.
Incuber à + 37°C ou à température ambiante, durée à fixer comprise entre 2 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 de 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 / puits. Incuber à température ambiante à l'obscurité.

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.
A titre d'exemple, 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.

La lecture de référence utilisée pour calculer les seuils pourra être celle effectuée à environ 2h.

***Remarques** : 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,…) défini et constant. L'utilisation de couvercles sur les microplaques et leur maintien 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. Validation des résultats

Les résultats ne sont interprétables qu'à partir du moment où tous les critères de validation des microplaques présentés dans la méthode officielle d'analyse « Techniques ELISA » (MOA 008) sont vérifiés.

9.2. Interprétation des lectures : détermination 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 = « Moyenne absorbances corrigées des TS » x 2
S2 = « Moyenne absorbances corrigées des TS » x 3

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

***Remarque** : le calcul n'est possible que si les valeurs des absorbances des TS ne sont pas trop faibles (> 0,010) et si le calcul du seuil donne une valeur d'absorbance ≥ 0,050. En effet, sur des valeurs d'absorbance très faibles le calcul devient aberrant car en dehors de la zone de proportionnalité substance colorante / valeur d'absorbance. Dans ce cas, un seuil de positivité donné en valeur corrigée, par exemple S2= 0,050 peut se substituer au seuil basé sur la moyenne des absorbances des témoins sains.*

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

9.3. Détermination et formulation du résultat d'analyse

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

Positif : La valeur de l'absorbance de l'essai est supérieure ou égale à S2
Le résultat est : « Banana bunchy top virus détecté dans l'échantillon analysé selon la technique ELISA ».

Indéterminé : La valeur de l'absorbance de l'essai est comprise dans l'intervalle S1-S2
Le résultat est : « La méthode ne permet pas de déterminer le statut de l'échantillon, des analyses complémentaires sont nécessaires ».

Négatif :La valeur de l'absorbance de l'essai est inférieure à S1
Le résultat est : « Banana bunchy top virus non détecté dans l'échantillon analysé selon la technique ELISA ».

***Remarque** : En cas de résultat indéterminé, il est souhaitable de refaire une analyse ELISA, selon le cas à partir du même extrait, d'une nouvelle prise d'essai ou d'un nouvel échantillon. Le recours à une technique d'analyse différente (test moléculaire) peut également être envisagé.*

10. Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants

Les virus sont des parasites stricts, les structures cellulaire hôtes sont indispensables à leur survie. Il est donc suffisant de détruire ou de déstructurer les tissus végétaux constituant l'échantillon pour éviter leur maintien et éventuellement leur dissémination.
Les insectes vecteurs peuvent aussi constituer une source de dissémination.
Le laboratoire doit mettre en œuvre des mesures prenant en compte ces risques 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) doit être autoclavé (sachet de broyage, tube, plaque de microtitration…).
Le matériel ayant été en contact avec le végétal infecté (ou de statut indéterminé) doit être désinfecté.

11. 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
Décret 2006-7 du 4 janvier 2006	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	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
Arrêté ministériel du 31 juillet 2000	Arrêté du 31 juillet 2000 établissant la liste des organismes nuisibles aux végétaux, produits végétaux et autres objets soumis à des mesure de lutte obligatoire
Arrêté ministériel du 17 octobre 1995	Arrêté du 17 octobre 1995 relatif aux conditions d'entrée par dérogation de matériel végétal de bananiers dans les départements d'outre-mer.
Arrêté ministériel du 3 décembre 1991	Arrêté du 3 décembre 1991 modifiant l'arrêté du 03-09-1990 relatif au contrôle sanitaire des végétaux et produits végétaux
Arrêté ministériel du 3 septembre 1990	Relatif au contrôle sanitaire des végétaux et produits végétaux
MOA 008	Méthode officielle d'analyse « Technique ELISA Bactériologie/Virologie »
REP 001	Répertoire des recettes en vigueur au LNPV
GLO 001	Glossaire des termes techniques en vigueur au LNPV
Dossier d'évaluation Réf. : BBTV_2010	Rapport d'évaluation de la technique ELISA et des différents antisera disponibles pour la détection du Banana bunchy top virus

BIBLIOGRAPHIE

1-Bos L.. 1983. Order out of chaos : Preservation in BOS, 102-104. *In* Introduction to plant virology, 160p., Pudoc Wageningen, Pays-Bas.

2-Burns, T.M., R.M. Harding and R.M. Dale, 1995. The genome organization of banana bunchy top virus : Analysis of six ssDNA components. *J. Gen. Virol*., 76:1471-1482.

3-Caruana, M.L., 2003. Analyse du Risque Phytosanitaire Bananiers Banana bunchy top virus BAN-v1.

4-Galal, A.M., 2007. Use of polymerase chain reaction for detecting Banana Bunchy Top Nanovirus. *Biotechnology* , 6 (1) : 53-56.

5-Hafner, G.J., R.M. Harding and J.L. Dale, 1995. Movement and transmission of Banana bunchy top virus DNA component one in banana*. J. Gen. Virol,* 76 : 2279-2285.

6-Hooks, C.R.R., 2008. Effect of banana bunchy top virus infection on morphology and growth characteristics of banana. *Ann. Appl. Biol.* 153 : 1-9.

7-Karan, M., R.M. Harding and J.L. Dale, 1994. Evidence for two groups of Banana bunchy top virus isolates. *J.Gen.Virol*, 75 : 3541-3546.

8-Soweha, H.E., 2005. Serological and Sero-molecular Studies on Banana Bunchy Top Disease and in Different Parts of Virus –infected Banana Plant. Journal of Agriculture & Social Sciences, 273-275.

9-Thomas, J.E. and R.G. Dietzgen, 1991. Purification, characterization and serological detection of virus–like particles associated with banana bunchy top disease in Australia. *J. Gen. Virol.,* 72: 217–24

10-Wu, R.Y. and H.J. Su, 1992. Detection of BBTV in diseased and symptomless banana plants with monoclonal antibody. *Trop. Agric.*, 69: 397–9

11-Xie, W.S. and J.S. Hu, 1995. Molecular cloning, sequence analysis and detection of banana bunchy top in Hawaii. *Molecular Plant Path*., 85 (3): 339-347.

ANNEXE 1-PLAN DE PLAQUES

	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

*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.

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.