



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

<p><b>Direction générale de l'alimentation</b>  <b>Service de la prévention des risques sanitaires de la production primaire</b>  <b>Sous-direction de la qualité et de la protection des végétaux</b>  <b>Bureau des semences et de la santé des végétaux</b></p> <p>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/2010-12-032          MOD10.21 C 12/05/10</p>	<p style="text-align: center;"><b>NOTE DE SERVICE</b>  <b>DGAL/SDQPV/N2010-8348</b>  <b>Date: 14 décembre 2010</b></p>
--	--

Date de mise en application : immédiate  
 Abroge et remplace : Sans objet  
 Date d'expiration : Sans objet  
 Date limite de réponse : Sans objet  
 Nombre d'annexes : 2  
 Degré et période de confidentialité : aucune

**Objet :** Méthode officielle d'analyse MOA 011 partie A et B version 1a relative à la détection du Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) sur racinelles de betterave 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 011 parties A et B version 1a relative à la détection du *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) sur racinelles de betteraves par la technique sérologique ELISA

**Mots-clés :** Virologie - méthode officielle – analyses - détection – Beet necrotic yellow vein virus – BNYVV - betterave

<b>Destinataires</b>
<p><b>Pour information :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- DRAAF-SRAL</li> <li>- DAF-SPV</li> <li>- LNPV</li> <li>- Laboratoires agréés</li> </ul>

Le Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV), organisme nuisible du genre *Benyvirus*, est l'agent responsable de la maladie de la rhizomanie de la betterave.

Dans l'Union Européenne, les premiers dégâts de la rhizomanie ont été observés au cours des années 1950, en Italie dans la plaine du Pô la vallée de l'Adige. La maladie est désormais présente dans la majorité des pays producteurs de betterave.

Les plants infectés par le BNYVV présentent des symptômes caractéristiques. Lorsque la maladie est avancée, des symptômes sur racines tels qu'une prolifération anarchique des petites racines partiellement nécrosées qui donne son nom à la maladie (rhizomanie ou follie racinaire) ou encore un brunissement des tissus vasculaires sont observés.

La BNYVV est transmis au *Beta sp.* et est maintenu dans le sol par *Polymyxa betae*, un protozoaire du sol, qui est un parasite intracellulaire confiné aux racines des *Chenopodiaceae*. Il est présent dans la plupart des sols où la betterave a été cultivée (dans toutes les parties de l'Europe) et il n'est pas connu pour provoquer des dégâts significatifs par lui-même.

La directive 2000/29CE liste les végétaux soumis à contrôle, pour la mise en circulation vers les zones protégées rhizomanie. Elle précise les exigences réglementaires pour la délivrance d'une mention spécifique sur le passeport phytosanitaire permettant la mise en circulation vers ces zones protégées.

La méthode officielle de détection du Beet necrotic yellow vein virus, qui repose sur l'emploi de la technique sérologique ELISA, précédée ou non par un test biologique suivant le cas, 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



# Détection du virus de la rhizomanie de la betterave

## Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV)

### Test biologique

METHODE OFFICIELLE D'ANALYSE



### 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.

n° méthode Numéro de la version	Consultation publique		Validité	
	Début	Fin	Début	Fin
VS/04/07 version c	-	-	2007	Décembre 2010 + 3 <sup>1</sup> mois
MOA 011 version1a	Août 2010	Octobre 2010	Décembre 2010	

<sup>1</sup> Pour la présente méthode, le délai de 18 mois n'est pas applicable. Il est ramené à 3 mois.

## SOMMAIRE

<b><u>PREAMBULE</u></b> .....	<b>4</b>
<u>Objet des méthodes officielles</u> .....	4
<u>Glossaire, abréviations et documents connexes</u> .....	4
<u>Limites imposées aux laboratoires agréés ou reconnus</u> .....	4
<u>Échantillonnage et échantillon</u> .....	4
<u>Modification des méthodes officielles</u> .....	4
<u>Considérations d'ordre métrologique</u> .....	5
<u>Obligations réglementaires et limites de responsabilité</u> .....	5
<u>Revue des méthodes officielles, amendement et modification</u> .....	6
<b><u>ORIGINE DE LA METHODE ET REMERCIEMENTS</u></b> .....	<b>7</b>
<b><u>PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE</u></b> .....	<b>8</b>
<u>Modifications</u> .....	8
<u>Améliorations</u> .....	8
<b><u>DESCRIPTION DE LA METHODE</u></b> .....	<b>9</b>
1. <u>Objet</u> .....	9
2. <u>Domaine d'application</u> .....	9
3. <u>Présentation schématique de la détection</u> .....	11
4. <u>Produits et consommables</u> .....	11
5. <u>Appareillage et matériel</u> .....	12
6. <u>Contrôles et témoins</u> .....	12
7. <u>prise d'analyse (le cas échéant)</u> .....	13
8. <u>Etapas de l'analyse</u> .....	13
8.1. <u>Test de piégeage</u> .....	13
8.1.1. <u>Analyses sur sol</u> : .....	13
8.1.2. <u>Analyses sur eau terreuse</u> : .....	13
8.1.3. <u>Analyses sur eau décantée</u> .....	13
8.2. <u>Dépotage</u> .....	14
8.3. <u>Préparation des échantillons pour analyse par ELISA</u> .....	14
9. <u>Résultats</u> .....	14
10. <u>Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants</u> .....	14
11. <u>Conservation des reliquats de matériels utilisés</u> .....	15
<b><u>LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE</u></b> .....	<b>16</b>
<b><u>BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE</u></b> .....	<b>17</b>

## **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).

<b>Volume</b>	<b>volume &lt; à 10 mL</b> : EMT = $\pm 10\%$ <b>Volume <math>\geq</math> à 10 mL</b> : EMT = $\pm 5\%$
<b>Masse</b>	EMT = 10%
<b>pH</b>	EMT = 0,3 u
<b>Température</b>	<b>incubateur</b> : EMT = $\pm 3^\circ\text{C}$ <b>réfrigérateur</b> : $5^\circ\text{C}$ et EMT = $\pm 4^\circ\text{C}$ <b>congélateur</b> : $\leq -18^\circ\text{C}$ <b>congélateur froid intense</b> : $\leq -65^\circ\text{C}$
<b>Longueur</b>	EMT = 10%
<b>Temps</b>	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**

Les méthodes officielles sont 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

Le laboratoire national de la protection des végétaux Station d'Angers remercie les anciens collègues du LNPV Unité de Flore Pathogène des Sols qui avaient évalué et rédigé la méthode VS/04/07 version c détection du virus de la rhizomanie de la betterave, Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) par test biologique suivi du test ELISA et qui nous ont transmis les éléments de connaissance de la méthode. Dorénavant, l'équipe du laboratoire national de référence pour la détection du virus de la rhizomanie de la betterave est le LNPV, station d'Angers (7 rue Jean Dixméras – 49044 ANGERS CEDEX 01).

Le travail de relecture et de révision a été effectué par le pôle « Développement de méthodes » au sein de ce même laboratoire.

## 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: la 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

Rectifications concernant l'ajout de charbon végétal actif dans la préparation des pots pour les témoins (§ 6).

Précisions sur la limite inférieure en terme de pesée des sous-échantillons (§ 8-3)

*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

### Détection du virus de la rhizomanie de la betterave, Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) - Test biologique

#### Introduction

Le virus de la rhizomanie de la betterave, Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV), est classé organisme de quarantaine et est visé par les annexes IB et IVB de la directive 2000/29/CE modifiée.

A ce titre, des analyses officielles de détection de ce virus doivent être effectuées sur les sols support de culture destinées à des zones protégées lors des échanges intra-communautaires.

La liste des zones protégées au regard de ce virus fait l'objet de décisions communautaires et est régulièrement actualisée.

#### 1. Objet.

Cette méthode s'applique pour la détection en routine, dans le sol, sur eau terreuse ou décantée, du virus de la rhizomanie de la betterave : le Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV), lui-même véhiculé par un protozoaire du sol (*Polymyxa betae*).

Le test biologique décrit dans la présente méthode vise à « piéger » le champignon éventuellement présent dans le sol et potentiellement porteur du virus sur une plante sensible en vue de la détection ensuite du virus sur cette plante hôte par ELISA (voir schéma de détection au point 3 ci-après).

#### 2. Domaine d'application.

##### Objets susceptibles d'être soumis à analyse.

La méthode s'applique à tout sol (ou eau terreuse ou décantée), matières fertilisantes et supports de culture dans la mesure où permettant un développement racinaire des plantes pièges suffisant pour réaliser le test dans les conditions définies ci-après.

##### Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse.

La méthode s'applique aux échantillons de sols (ou eau terreuse ou décantée) à tester puis aux racines et/ou tiges de betteraves cultivées sur ces milieux.

Attention, si les sols analysés ont fait l'objet de traitements herbicides avant leur prélèvement pour analyse, ceux-ci peuvent être susceptibles d'entraîner des difficultés de levée des plantules de betteraves pièges utilisées et donc d'empêcher la réalisation de l'analyse. Les sols à analyser doivent donc être prélevés si possible avant tout traitement herbicide.

##### Grandeur de l'objet soumis à analyse.

###### Prélèvement sur sol :

Un échantillon représente un prélèvement effectué sur le terrain de 2.5L de terre par hectare comme décrit ci-dessous.

Compte tenu du caractère « hétérogène en agrégats » (foyers) de la plupart des champignons du sol, la procédure formelle consiste à découper une parcelle en sous-unité de 1000 m<sup>2</sup> et à réaliser 10 prises de 250 mL (une tous les 100 m<sup>2</sup>) par sous-unités, regroupées en un échantillon.

Quand une parcelle n'est pas suspectée d'être contaminée, il est envisageable « d'élargir la maille » à raison d'un échantillon par hectare, constitué du regroupement de 10 à 15 prises de 250 mL. En

revanche, en situation de zones potentiellement contaminées, le protocole de base (un échantillon = 10 prises sur 1000 m<sup>2</sup>) doit impérativement être respecté.

Remarque : Pour les grandes parcelles, et compte tenu des coûts engendrés, on ne retiendra que 3 échantillons, répertoriés sur un plan, par tranche de 10 hectares homogène.

Préparation de l'échantillon de sol pour envoi au laboratoire :

- Etiquetage identique au prélèvement de plantes avec repérage sur un plan.
- Ne jamais laisser les sacs au soleil ou à une température supérieure à 35°C, même momentanément.
- Stocker, si nécessaire avant envoi, au frais (cave) et au maximum un mois.
- Répartir les échantillons en containers résistants (caisses ou cartons opaques).
- Prévenir le laboratoire destinataire.

Cas particulier de l'eau terreuse :

Un échantillon d'eau terreuse se définit comme un échantillon de consistance liquide ou semi-liquide à forte teneur en éléments solides récupérables par décantation.

L'échantillon minimum doit pouvoir fournir 250 mL de phase solide après décantation.

Cas particulier de l'eau décantée :

Un échantillon d'eau décantée se définit comme un échantillon de consistance liquide à faible teneur en éléments solides.

Cet échantillon servira d'eau d'arrosage afin de contaminer, le cas échéant, la préparation initiale de terreau stérile + sable.

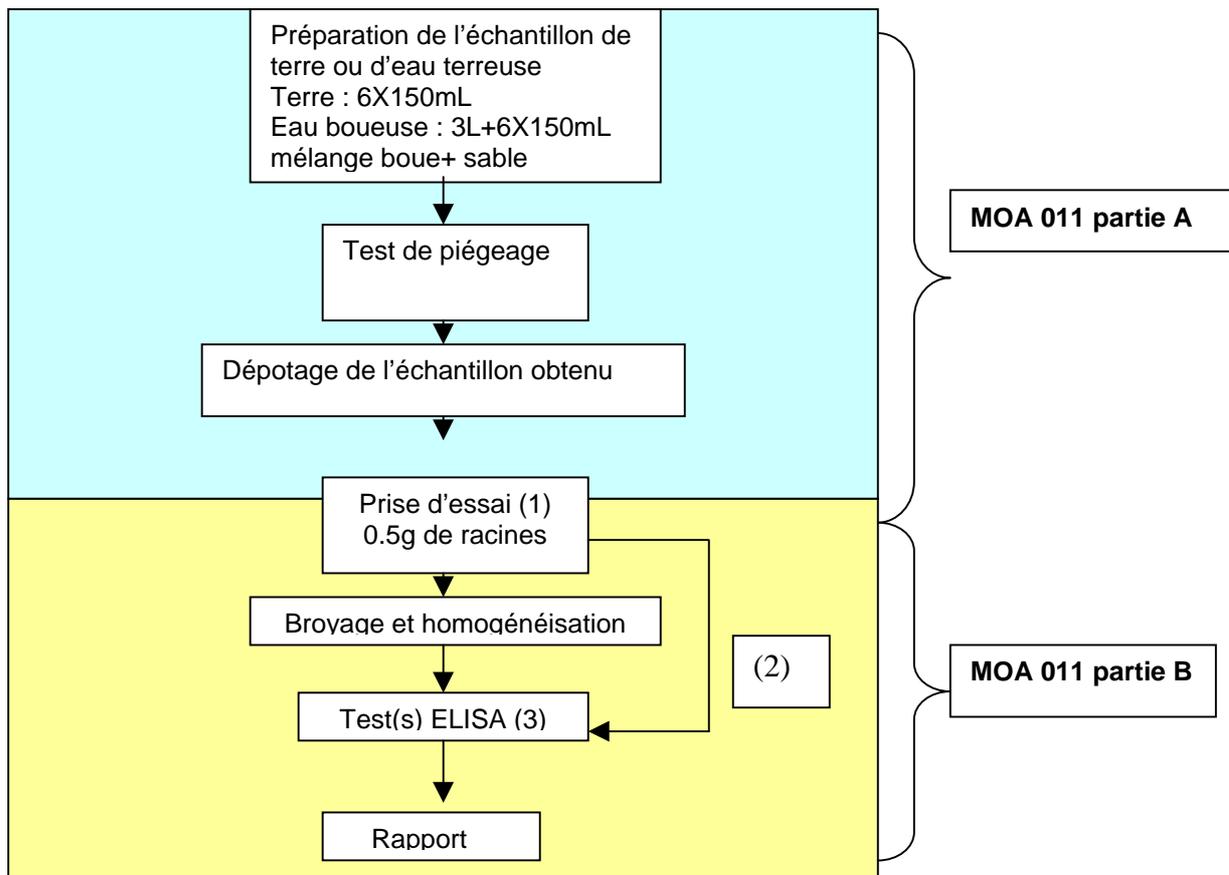
L'échantillon minimum est de 3 litres.

**Précaution(s) particulière(s) à prendre.**

Stocker l'échantillon pendant environ 6 mois sous abri (non climatisé) pour permettre un éventuel test complémentaire.

Le désinfecter avant élimination.

### 3. Présentation schématique de la détection



- (1) la première prise d'essai est à utiliser dans la journée, si une deuxième prise d'essai est possible, elle doit être conservée au congélateur ou au réfrigérateur après lyophilisation pour une éventuelle analyse supplémentaire ou complémentaire (lors d'une analyse ultérieure, le mode de conservation de cette deuxième prise d'essai doit être indiqué).
- (2) Le cas échéant, en cas d'analyse de confirmation, sur la deuxième prise d'essai (ou le broyat de la première prise d'essai)
- (3) Plusieurs tests ELISA peuvent être faits sur le même broyat, notamment en cas de résultat indéterminé

### 4. Produits et consommables

Rappel : En règle générale, le manipulateur 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 contamination (ADN ou ARN), de nucléase, d'inhibiteur 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.

Pour la mise en œuvre de la présente méthode, le laboratoire sera amené à utiliser de :

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

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

## 5. Appareillage et matériel

### Gros matériel :

- Chambre climatisée : 6000-10 000 lux (15h jour/9h nuit), humidité relative proche de 80%, T°C = 25°C ± 4°C.
- Centrifugeuse (2000 à 3000g) : facultatif
- Dessiccateur lent réglé à 25°C ± 5°C (peut être remplacé par un séchage à l'air libre).

### Petit matériel :

- Sac plastique ou tout autre contenant étanche.
- Tamis à 5 mm (tamisage des terres).
- Nappe d'irrigation
- Godet percé : pot individuel de volume 150 mL.
- Barquette pouvant contenir 6 pots de 150 mL côte à côte.
- Papier absorbant
- Semences de betterave de variété sensible à la rhizomanie et enrobées de fongicide contre les fontes de semis
- sachets ?

## 6. Contrôles et témoins

Comme dans tout test biologique et/ou chimique, il est nécessaire d'intégrer des témoins sains et malades afin de vérifier le bon déroulement du test et de pouvoir en valider son fonctionnement.

Ces témoins sont constitués :

### **- de témoins sains (TS) :**

Analyses sur sol: les témoins sains sont constitués de 3 pots de 150 mL de terreau stérile auxquels sont ajoutés, à chacun, 0.673g de charbon végétal actif.

Analyses sur eau terreuse : les témoins sains sont constitués de 3 pots de 150 mL avec un mélange de ¼ de terreau stérile pour ¾ de sable auxquels sont ajoutés, à chacun, 0.673g de charbon végétal actif.

Analyses sur eau décantée : les témoins sains sont constitués de 3 pots de 150 mL avec un mélange de ½ de terreau stérile pour ½ de sable auxquels sont ajoutés, à chacun, 0.673g de charbon végétal actif.

Ces témoins sains sont ensuite ensemencés avec des graines de betteraves sensibles à la rhizomanie dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser. Ils seront arrosés avec de l'eau permutée, distillée ou osmosée. Il est préférable d'effectuer les manipulations de ces témoins sains en premier afin d'éviter toute contamination ultérieure.

### **-des témoins malades (TM) :**

Analyses sur sol : les témoins malades sont constitués de 2 pots de 150 mL de terre reconnue contaminée auxquels sont ajoutés, à chacun, 0.673g de charbon végétal actif.

Analyses sur eau terreuse : les témoins malades sont constitués de 2 pots de 150 mL avec un mélange de ¼ de terre reconnue contaminée pour ¾ de sable auxquels sont ajoutés ; à chacun, 0.673g de charbon végétal actif.

Analyses sur eau décantée : les témoins malades sont constitués de 2 pots de 150 mL avec un mélange de ½ de terreau stérile pour ½ de sable auxquels sont ajoutés, à chacun, 0.673g de charbon végétal actif. Ces témoins seront arrosés tout au long du test avec un mélange d'eau décantée de 300 mL de terre contaminée + 1 litre d'eau permutée, distillée ou osmosée.

Ces témoins malades sont ensuite ensemencés avec des graines de betteraves sensibles à la rhizomanie dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser. Dans les cas des analyses sur sol et sur eau terreuse uniquement, arroser avec de l'eau permutée, distillée ou osmosée.

Il est préférable d'effectuer les manipulations de ce témoin malade en dernier.

## 7. prise d'analyse (le cas échéant)

Analyses sur sol : Dans les jours suivant la réception et en fonction de l'humidité de l'échantillon, ce dernier est séché au dessiccateur lent (ou l'air libre) pour être tamisé à 5 mm avant stockage à température ambiante dans des contenants hermétiques. Le laboratoire veillera à éviter une trop grande dessiccation de la terre.

Ce stockage avant analyse ne pourra excéder un mois.

La prise d'essai pour analyse est constituée de 6 X 150 mL de terre (900mL) à analyser bien homogénéisée.

Analyses sur eau terreuse : la prise d'essai est constituée de 6 pots de 150 mL du mélange ¼ de phase solide récupérée après décantation et ¾ de sable.

Analyses sur eau décantée : la prise d'essai est constituée de 3 litres d'eau décantée.

## 8. Etapes de l'analyse

### 8.1. Test de piégeage

#### 8.1.1. Analyses sur sol :

- Mélanger la terre à analyser de manière à bien homogénéiser l'échantillon.
- Incorporer 4.038g de charbon végétal actif (permet de capter les éventuelles molécules chimiques présentes dans le sol à analyser et responsables de phytotoxicité dans 900 mL de cette terre).
- Remplir 6 pots de 150 mL avec les 7/8<sup>ème</sup> de ce mélange.
- Semer une vingtaine de graines de betteraves par pot voir plus si le taux de germination du lot de graines est faible.
- Compléter les 6 pots avec le mélange.
- Placer les 6 pots dans une barquette munie d'une nappe d'irrigation dans le fond.
  
- Arroser les pots par le fond par capillarité avec de l'eau permutée, distillée ou osmosée sans atteindre la saturation.
- Recouvrir les pots avec des couvercles transparents.
- Placer la barquette dans la chambre climatique réglée selon les indications données en 5.1.
- Surveiller la levée et enlever les couvercles dès que celle-ci a lieu.
- Arroser régulièrement les pots par le fond à saturation.
- **Eviter d'éclabousser lors de l'arrosage.**
- Analyser les plantes entre 21 et 28 jours après semis dans les pots.

#### 8.1.2. Analyses sur eau terreuse :

Procéder comme au 8.1.1 en utilisant le mélange préparé à partir des éléments solides récupérés après décantation comme indiqué point 7.

#### 8.1.3. Analyses sur eau décantée

- Mélanger 450 mL de terreau stérile et 450 mL de sable.
- Remplir 6 pots de 150 mL du mélange.
- Procéder ensuite comme indiqué en 8.1.1 en arrosant chaque série de 6 pots avec l'échantillon d'eau décantée à analyser en remplacement de l'eau d'arrosage.

## 8.2. Dépotage

- Dépoter chaque pot individuellement afin de dégager les racinelles des débris (organiques et terreux) par lavage délicat à l'eau courante sur un tamis maillé de 1 à 2mm (qui a pour but de retenir les plantules et racinelles).
- Conserver les plantules nettoyées ainsi pot à pot.

Si l'analyse des échantillons par ELISA (MOA 01 partie B) est impossible dans les 24 heures suivant le dépotage, il est préférable soit de conserver les échantillons à  $5^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$  enrobés dans du papier aluminium afin d'éviter le dessèchement (48 heures maximum), soit à  $<-15^{\circ}\text{C}$  pour une conservation plus longue dans une limite maximale de 6 mois.

## 8.3. Préparation des échantillons pour analyse par ELISA

L'échantillon pour analyse est constitué à partir des plantules ayant servi au piégeage et dont l'appareil racinaire a été lavé.

Pour chaque échantillon de sol reçu, choisir 5 pots de culture parmi les 6. Ces 5 pots servent chacun à la préparation de 5 sous-échantillons. Sur chaque pot effectuer un prélèvement sur tige et racinelles pour atteindre  $0,5\text{g} \pm 0,1\text{g}$  par sous échantillon.

Les échantillons préparés peuvent être conservés quelques heures à  $5^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$  avant analyse.

Une deuxième prise d'essai de  $0,5\text{g} \pm 0,1\text{g}$  sera effectuée si la quantité de plantules le permet, dans tous les cas le reste du matériel végétal, sera conservé soit à  $5^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$  pour une deuxième analyse dans les 48h suivant le dépotage si nécessaire, soit à  $<-15^{\circ}\text{C}$  (pour une conservation maximale de 6 mois).

Remarque : Si la pesée de chaque sous échantillon n'atteint pas 0.5g, le ratio poids/tampon de broyage sera adapté. La pesée de chaque sous-échantillon ne peut pas être inférieure à 0.2g.

Les échantillons pour analyse sont prêts pour engager un test ELISA (voir MOA 011 partie B)

## 9. Résultats

Lors de la levée des plants, noter toute absence de levée ou levée partielle. Ceci permettra d'émettre une réserve sur le résultat d'analyse qui pourra préciser que « du fait d'une absence de levée suffisante des plantules de betteraves, l'analyse n'a pas pu être réalisée » et si possible demander un nouvel échantillon.



## 10. Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants

Afin d'éviter toute contamination de l'environnement via les eaux usées et les effluents, les eaux de lavage des plantes doivent être traitées avant rejet par un produit virucide répondant à la norme NF T 72-180 (efficacité sur les virus non enveloppés).

Tout fragment de végétal doit être détruit par autoclavage ou par trempage dans un produit répondant à la norme NF T 72-180.

Tout échantillon de terre ou eau terreuse ou décantée doit être désinfecté avant élimination.

## **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, 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
<b>Directive 2000/29/CE modifiée, annexes IB et IVB</b>	Directive de classement des organismes de quarantaine et définissant les zones protégées de l'Europe communautaire.
<b>Décret 2006-7 du 4 janvier 2006</b>	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
<b>Arrêté ministériel du 19 décembre 2007</b>	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
<b>MOA 009 version 1a</b>	Méthode d'analyse générale officielle Technique ELISA Bactériologie/Virologie
<b>GLO 001</b>	Glossaire des termes techniques en vigueur au LNPV
<b>REP 001</b>	Répertoire des recettes en vigueur au LNPV

## REMERCIEMENTS

Le LNPV Station d'Angers remercie le LDA 22 et le laboratoire de Loos en Gohelle pour la relecture attentive de la version 1a de la présente méthode et les suggestions qu'ils ont formulées pour l'amélioration de cette dernière.

## BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE

**PROTOCOLE OEPP PM7/30 (2) 2006 OEPP/EPPO**, *Beet necrotic yellow vein virus* (benyvirus).  
Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 36, 429–440

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](mailto: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](http://www.agriculture.gouv.fr)**

auprès de qui toute autre correspondance peut être adressée.



# Détection du virus de la rhizomanie de la betterave

## Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV)

### par la méthode sérologique ELISA

METHODE OFFICIELLE D'ANALYSE



### 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.

n° méthode Numéro de la version	Consultation publique		Validité	
	Début	Fin	Début	Fin
VH/05/09 version a	-	-	Mars 2005	Octobre 2010 + 3 mois
VS/04/07 version c	-	-	2007	Décembre 2010 + 3 mois <sup>1</sup>
MOA011 partie B version1a	Juillet 2010	Septembre 2010	Décembre 2010	

<sup>1</sup> Pour le présente méthode, le délai de 18 mois n'est pas applicable. Il est ramené à 3 mois du fait des informations connues sur les réactifs sérologiques.

## SOMMAIRE

<b><u>PREAMBULE</u></b> .....	<b>5</b>
<u>Objet des méthodes officielles</u> .....	5
<u>Glossaire, abréviations et documents connexes</u> .....	5
<u>Limites imposées aux laboratoires agréés ou reconnus</u> .....	5
<u>Échantillonnage et échantillon</u> .....	5
<u>Modification des méthodes officielles</u> .....	5
<u>Considérations d'ordre métrologique</u> .....	6
<u>Obligations réglementaires et limites de responsabilité</u> .....	6
<u>Revue des méthodes officielles, amendement et modification</u> .....	7
<b><u>ORIGINE DE LA METHODE ET REMERCIEMENTS</u></b> .....	<b>8</b>
<b><u>PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE</u></b> .....	<b>9</b>
<u>Modifications</u> .....	9
<u>Améliorations</u> .....	9
<b><u>DESCRIPTION DE LA METHODE</u></b> .....	<b>10</b>
1. <u>Objet</u> .....	10
2. <u>Domaine d'application</u> .....	10
3. <u>Présentation schématique de la détection</u> .....	11
4. <u>Produits et consommables</u> .....	12
4.1. <u>Tampons</u> .....	12
4.2. <u>Réactifs sérologiques</u> .....	12
4.3. <u>Autres consommables (le cas échéant)</u> .....	12
5. <u>Appareillage et matériel</u> .....	13
6. <u>Contrôles et témoins</u> .....	13
7. <u>Préparation des échantillons</u> .....	14
7.1. <u>A partir d'échantillons végétaux</u> .....	14
7.2. <u>A partir des plantules obtenues lors du test de piégeage</u> .....	14
7.3. <u>Cas particulier</u> .....	14
8. <u>Étapes de l'analyse</u> .....	14
8.1. <u>Plan de plaque</u> .....	14
8.2. <u>Broyage</u> .....	14
8.3. <u>Déroulement du test</u> .....	15
9. <u>Résultats</u> .....	16
9.1. <u>Validation des résultats</u> .....	16
9.2. <u>Interprétation et formulation des résultats</u> .....	16
10. <u>Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants</u> .....	17

11. Conservation des reliquats de matériels utilisés.....17

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE .....18

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE .....19

## 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).

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

Le laboratoire national de la protection des végétaux Station d'Angers remercie les anciens collègues du LNPV de Montfavet qui avaient évalué et rédigé la méthode VH/05/09 version a de détection du virus de la rhizomanie de la betterave, Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV), par la méthode ELISA et qui nous ont transmis les éléments de connaissance de la méthode ainsi que ceux du LNPV Unité de Flore Pathogène des Sols qui avaient évalué et rédigé la méthode VS/04/07 version c détection du virus de la rhizomanie de la betterave (Beet necrotic yellow vein virus) par test biologique suivi du test ELISA. Dorénavant, l'équipe du laboratoire national de référence pour la détection du virus de la rhizomanie de la betterave est le LNPV, station d'Angers (7 rue Jean Dixméras – 49044 ANGERS CEDEX 01).

Le travail de relecture et de révision a été effectué par le pôle « Développement de méthodes » au sein de ce même laboratoire.

## 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: la 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

Aucune

### AMELIORATIONS

Précision concernant le poids de l'échantillon minimum traité (fin du §2)

Précision concernant l'utilisation de la deuxième prise d'essai (§3).

Précisions concernant l'utilisation des puits de bordure et des positifs sur la plaque (§ 8-1).

Précisions concernant la lecture de référence pour le calcul des seuils d'interprétation. (§ 8-3)

Précisions concernant le mode de calcul des seuils (DO brutes) (§ 9-2.1).

Améliorations de pure forme (y compris les corrections grammaticales ou orthographiques) non détaillées.

## DESCRIPTION DE LA METHODE

### Détection du virus de la rhizomanie de la betterave, Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV), par la méthode sérologique ELISA

#### 1. Objet.

Cette méthode s'applique à la détection en routine, dans les racines de betteraves et d'épinards, du virus de la rhizomanie de la betterave : le Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV), lui-même véhiculé par un protozoaire du sol (*Polymyxa betae*).

#### 2. Domaine d'application.

##### Objets susceptibles d'être soumis à analyse.

La méthode s'applique à des échantillons de plantes de betteraves ou d'épinards pouvant être infectés par le BNYVV.

Ces plantes peuvent être :

- des échantillons directement transmis au laboratoire pour détection du BNYVV par ELISA
- les plantules issues de la levée des graines lors du test de piégeage pour tester des échantillons de sols (ou d'eau terreuse ou décantée) obtenues conformément à la **partie A** de la présente méthode.

##### Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse.

Dans le cas d'échantillons de végétal directement transmis, les échantillons doivent arriver au laboratoire en bon état, (propres, frais et non nécrosés ...). Dans le cas contraire, le laboratoire émet une réserve sur tout résultat d'analyse négatif en précisant l'état dégradé de l'échantillon à la réception.

##### Grandeur de l'objet soumis à analyse.

###### Analyses sur végétal :

L'échantillon est constitué de plantes, avec un appareil racinaire le plus préservé possible. Un échantillon est constitué d'un prélèvement de 15 plantes, excepté pour la Bretagne (zone protégée) où un échantillon est composé de 30 plantes, prélevées dans une zone homogène.

###### Analyses sur sol (ou eau terreuse ou décantée) – suite de la MOA 011 partie A - :

L'échantillon pour analyse est constitué à partir des plantules ayant servi au piégeage et dont l'appareil racinaire a été lavé.

Rappel : Chaque échantillon est constitué de 5 sous échantillons (correspondant à 5 pots de culture parmi les 6). Le prélèvement s'effectue sur tige + racines avec pesée de  $0,5g \pm 0,1g$  par sous échantillon.

##### Précaution(s) particulière(s) à prendre.

###### Analyses sur végétal :

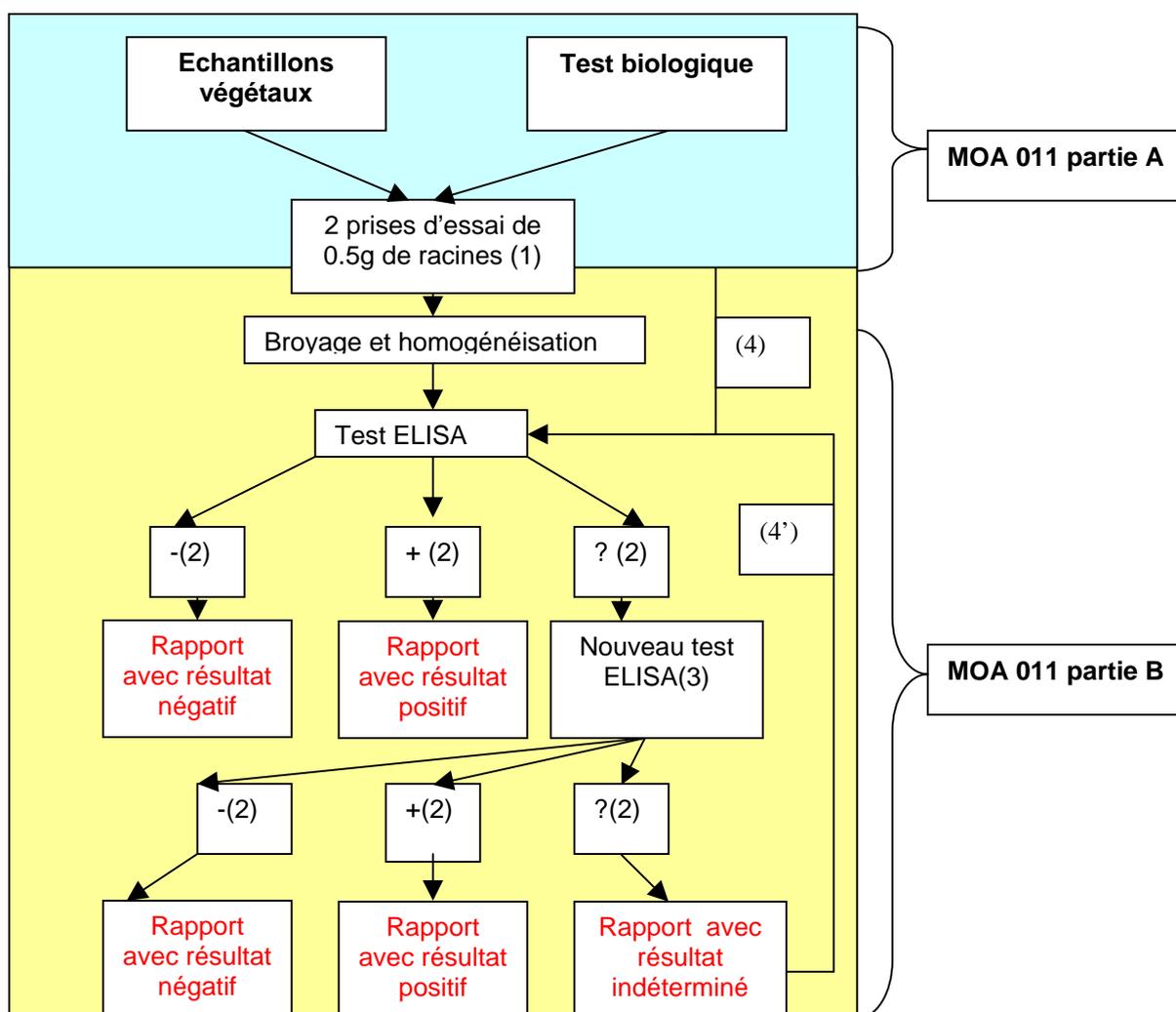
Dans l'attente d'une préparation de l'échantillon pour analyse, ce dernier sera entreposé dans une chambre climatique à  $4^{\circ}C \pm 5^{\circ} C$  au maximum un mois pour ne pas altérer la fraîcheur des tissus végétaux.

Une fois préparée (voir §7), la première fraction de prélèvement de racines doit être traitée le jour même. La deuxième fraction sera conservée par toute méthode n'altérant pas les propriétés sérologiques du virus (par exemple : lyophilisation, congélation), pour permettre de faire effectuer, si nécessaire, une analyse de contrôle des résultats par le laboratoire de référence.

Analyses sur sol (ou eau terreuse ou décantée) :

Si la pesée de chaque sous échantillon n'atteint pas 0.5g (minimum 0.2g), le ratio poids/tampon de broyage sera adapté. S'il reste du matériel végétal, celui-ci sera conservé soit à 5°C ± 4°C si une deuxième analyse dans les 48h suivant le dépôtage est nécessaire, soit à <-15°C (pour une conservation maximale de 6 mois).

**3. Présentation schématique de la détection**



- (1) la première prise d'essai est à utiliser dans la journée, l'éventuelle deuxième prise d'essai doit être conservée au congélateur ou au réfrigérateur (après lyophilisation, si possible) pour une éventuelle analyse supplémentaire ou complémentaire (lors d'une analyse ultérieure, le mode de conservation de cette deuxième prise d'essai doit être indiqué)
- (2) Résultat après validation et interprétation
- (3) Nouveau test ELISA effectué avec le même sérum et/ou un sérum d'un autre fournisseur afin de statuer sur un résultat indéterminé. Ce nouveau test peut être effectué par la laboratoire agréé ayant effectué l'analyse ou le laboratoire national de référence.
- (4) et (4') Analyse de confirmation (réalisée par le LNR) qui pourra être effectuée sur le broyat végétal réalisé (s'il est correctement conservé et en quantité suffisante) (4) ou sur le doublon gardé lors de la préparation de la prise d'essai (4).

## 4. Produits et consommables

Rappel : En règle générale, le manipulateur 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 contamination (ADN ou ARN), de nucléase, d'inhibiteur 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.

### 4.1. 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 ou en tout cas conformes à ceux décrits dans le REP 001.

### 4.2. Réactifs sérologiques

Le laboratoire utilisera des réactifs spécifiques du BNYVV, en général souche F3, polyclonaux et/ou monoclonaux.

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.

Rappel : les antisera doivent faire l'objet des contrôles et vérifications décrits dans la MOA 008.

### 4.3. Autres consommables (le cas échéant)

**-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

Se référer aux préconisations de la Méthode **MOA 008 technique ELISA** (§3.2).

## 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) :**

Analyses sur végétal : il s'agit de références " racines de betteraves non infectées" ou de toutes autres racines saines de la même espèce que les échantillons traités. Il est préférable que la forme d'utilisation soit identique à celle de l'échantillon : fraîche, congelée ou lyophilisée. Les témoins sains sont traités en parallèle et selon les mêmes conditions que les échantillons de racines de betterave à analyser. Ils sont au minimum trois et issus, dans la mesure du possible, de broyats différents.

La variété de racines de betteraves saines servant de témoins sains (ou de tout autre espèce) doit être dans la mesure du possible, la plus proche des échantillons traités. En effet, des absorbances très différentes peuvent être obtenues selon les variétés utilisées.

Analyses sur sol (ou eau terreuse ou décantée) : les témoins sains correspondent aux racines de betteraves ayant poussé sur milieu témoin sain (terreau stérile ou terreau stérile en mélange avec du sable) et sont au nombre de 3 (3 pots). Ils sont préparés de façon identique aux échantillons à analyser. Les trois pots sont utilisés.

Si possible, traiter les témoins sains avant les témoins malades. Ces témoins sains serviront à déterminer le seuil de positivité.

### **-des témoins malades (TM) :**

Analyses sur végétal : ils donnent au minimum l'assurance d'un déroulement correct de la manipulation. Pour chaque série d'analyses, on peut soit utiliser des végétaux identifiés contaminés et préparés au laboratoire (échantillon de référence naturellement contaminé ou souche multipliée par indexage) ou des témoins commerciaux lyophilisés à préparer selon les recommandations du fournisseur.

Analyses sur sol (ou eau terreuse ou décantée) : les témoins malades correspondent aux racines de betterave ayant poussé sur milieu témoin réputé contaminé et préparées comme les échantillons à tester. Ils sont au nombre de 2 (2 pots). Un seul pot peut être utilisé.

En complément d'un témoin malade (TM) à concentration virale élevée, il est conseillé d'utiliser un TMc présentant des valeurs d'absorbances (ou densités optiques (D.O.)) "calibrées" et situées nettement en dessous des valeurs de saturation lors de la lecture de référence. Ainsi, on pourra détecter de petites anomalies de déroulement du test, susceptibles d'entraîner la non détection d'échantillons faiblement infectés. Le laboratoire de référence peut délivrer des conseils pour constituer de tels TMc.

### **-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 vérifier que celui-ci est indemne de toute contamination susceptible de modifier les résultats d'analyse.

### **-des témoins substrat** (appelés également puits substrat).

La première colonne des plaques de microtitration peut être remplie lors de la dernière étape, uniquement de la solution de substrat afin de vérifier que la dégradation naturelle du substrat et son utilisation sont normales.

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.

## 7. Préparation des échantillons

### 7.1. A partir d'échantillons végétaux

Après avoir lavé et nettoyé les plantes, les répartir en 5 sous-échantillons de 3 plantes chacun (10 sous-échantillons de 3 plantes chacun pour la Bretagne).

Prélever sur chacun des sous-échantillons des racines, ou à défaut de l'épiderme de la racine, afin de préparer 2 fractions de 0.5 g par sous-échantillon constituant les deux prises d'essai, en respectant la meilleure homogénéité possible entre les fractions.

### 7.2. A partir des plantules obtenues lors du test de piégeage

Voir MOA 011 partie A.

### 7.3. Cas particulier

Dans le cas particulier des analyses de confirmation, le test ELISA est réalisé :

- soit à partir du reste du broyat ayant servi à la première analyse ;
- soit à partir de la seconde prise d'essai.

## 8. Etapes de l'analyse

### 8.1. Plan de plaque

Les puits de bordure ne sont pas utilisés (phénomènes aléatoires observés modifiant l'absorbance). Ils sont remplis d'eau permutée ou distillée ou osmosée lors du dépôt d'anticorps, du dépôt des broyats et du dépôt du conjugué.

Établir soigneusement le plan de distribution (plan de plaque) et d'identification des extraits à l'intérieur de la plaque. Chaque échantillon est répété au moins 1 fois soit 2 cupules par échantillon.

- Les témoins sains (TS), au nombre de 3, sont répartis uniformément sur la plaque. (2 puits/TS)
- Chaque échantillon est déposé dans deux puits adjacents.
- Les témoins positifs, 1 au minimum, déposés sur deux puits, sont issus du broyat d'un échantillon détecté positif ou d'un témoin positif validé comme tel. Le deuxième puits peut être rempli d'une dilution du premier.
- Deux puits au minimum sont réservés au témoin tampon de broyage: Le jus de plante est remplacé par du tampon de broyage (contrôle du bruit de fond).

### 8.2. Broyage

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 : 0,5g de matériel végétal frais pour 4,5mL de tampon ou 0,04g de matériel végétal lyophilisé pour 5mL de tampon), à l'aide

d'un broyeur à billes, ou de toute autre méthode de broyage permettant d'obtenir des résultats équivalents.

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

Les broyats obtenus doivent être conservés au réfrigérateur et utilisés le plus rapidement possible (au plus tard dans la journée). Après dépôt, les extraits sont congelés et conservés à une température inférieure ou égale à  $-18^{\circ}\text{C}$  dans l'attente d'un résultat définitif. Ils pourront servir à une éventuelle confirmation.

### 8.3. 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 cupules des microplaques à raison de  $100\ \mu\text{l}$  / cupule. Recouvrir la plaque d'un couvercle et mettre éventuellement la plaque en chambre humide. Incuber à  $+37^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ , durée à fixer comprise entre 2 et 4h.

**Lavages** : les lavages peuvent être effectués à l'aide d'un laveur de plaques ou manuellement de la manière suivante :

Vider vigoureusement les plaques.

Procéder ensuite à 3 rinçages de 3 min avec du tampon lavage.

Lors du dernier rinçage, éliminer le restant en tapant les plaques sur du papier absorbant. Ne pas laisser sécher la plaque. Pendant le dépôt des broyats, il est préférable d'égoutter une plaque et de laisser les autres en attente dans du tampon de lavage.

**Dépôt des extraits** : remplir les cupules à raison de  $100\ \mu\text{L}$  / cupule avec les extraits de plante.

Recouvrir la plaque d'un couvercle et mettre éventuellement la plaque en chambre humide.

Incuber au réfrigérateur à  $+5^{\circ}\text{C}$  pendant une nuit.

**Lavages** : aspirer chaque puits un par un ou les vider énergiquement en évitant de contaminer les puits entre eux. Effectuer un premier lavage rapide suivi de 3 lavages effectués comme précédemment..

#### **Dépôt du deuxième anticorps (selon fournisseur : ex Adgen)**

Cette étape est prévue dans le cadre d'un TAS-ELISA prévue par certains fournisseurs.

Procéder comme pour l'étape de coating décrite ci-dessus.

**Lavages** : identiques à ceux effectués après le coating.

**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 cupules à raison de  $100\ \mu\text{l}$  / cupule.

Recouvrir la plaque d'un couvercle et mettre éventuellement la plaque en chambre humide.

Incuber à  $+30^{\circ}\text{C}$  ou  $+37^{\circ}\text{C}$ , durée à fixer comprise entre 2 et 4h.

**Lavages** : identiques à ceux effectués après le coating.

**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  $1\text{mg/ml}$ . Remplir les cupules des microplaques à raison de  $100\ \mu\text{L}$  / cupule. Agiter la plaque éventuellement sur agitateur spécifique.

Recouvrir la plaque d'un couvercle et mettre éventuellement la plaque en chambre humide ainsi qu'à l'obscurité.

Incuber à température ambiante.

**Lecture** : pour le marqueur phosphatase alcaline et le p-Nitrophényl Phosphate comme substrat, la lecture se fait à une longueur d'ondes de 405 nm. Plusieurs lectures peuvent être réalisées à des temps différents afin d'évaluer la cinétique enzymatique.

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 doit être celle effectuée à 2h, sauf prescription contraire du fournisseur.

**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, luminosité,...) défini et constant. L'utilisation de couvercles sur les microplaques et leur maintien en étuve à l'obscurité 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 plaques présentés dans la méthode d'analyse officielle MOA 008 technique ELISA sont vérifiés.

### 9.2. Interprétation et formulation des résultats

L'utilisation des seuils définis ci-après est obligatoire.

#### ➤ 9.2.1. Détermination de deux seuils :

Les densités optiques utilisées pour calculer les différents seuils sont les densités optiques brutes de lecture obtenues à l'aide du spectrophotomètre.

**Seuil 1 = MTS + (3 x écart type des D.O. brutes des TS)**

**Seuil 1bis = MTS x 1,1**

**Seuil 2 = MTS x 2**

TS : témoin sain.

MTS : moyenne de l'absorbance des puits témoins sains.

La valeur du seuil 1 choisie parmi les 2 modes de calcul (1 et 1bis) est celle qui correspond à la valeur calculée la plus forte.

#### ➤ 9.2.2. Interprétation

La combinaison des deux seuils permet de définir 3 zones :



Pour les échantillons pour lesquels un résultat indéterminé est obtenu, une nouvelle analyse selon la même méthode sur les parties de l'échantillon conservées soit au congélateur, soit lyophilisées, sera réalisée à l'aide d'un second antiserum.

Le cas échéant, l'échantillon pourra, selon les cas :

- faire l'objet d'une analyse de confirmation dans un autre laboratoire, de préférence par le laboratoire de référence;
- ou être analysé par une méthode différente

### ➤ 9.2.3. Formulation

Les résultats seront exprimés sous une forme du type :

- **échantillon positif** : virus de la rhizomanie détecté dans l'échantillon analysé,
- **échantillon négatif** : virus de la rhizomanie non détecté dans l'échantillon analysé,
- **statut de l'échantillon indéterminé** : Résultat sérologique indéterminé selon les limites des méthodes de détection utilisées.

## 10. Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants

Afin d'éviter toute contamination de l'environnement via les eaux usées et les effluents, les eaux de lavage des plantes doivent être traitées avant rejet par un produit virucide répondant aux normes NF EN 14476:200508 et NF EN 14675:200607 (efficacité sur les virus non enveloppés).

Tout fragment de végétal doit être détruit par autoclavage ou par trempage dans un produit répondant à ces normes.

## 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, 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
<b>Décret 2006-7 du 4 janvier 2006</b>	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
<b>Arrêté ministériel du 19 décembre 2007</b>	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
<b>MOA 008 version 1a</b>	Techniques ELISA
<b>Directive 2000/29/CE modifiée</b>	Directive de classement des organismes de quarantaine et définissant les zones protégées de l'Europe communautaire.
<b>REP 001</b>	Répertoire des recettes en vigueur au LNPV
<b>GLO 001</b>	Glossaire des termes techniques en vigueur au LNPV

## REMERCIEMENTS

Le LNPV Station d'Angers remercie également le LDA 22 et le laboratoire de Loos en Gohelle pour la relecture attentive de la version 1a de la présente méthode et des suggestions qu'ils ont formulées pour l'amélioration de cette dernière.

## BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE

**CLARK MF . and ADAMS AN. (1977)** – Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J.Gen.Virol.* 34, 475-483.

**RYSANCK P., STOCHY G. , HABERLE AM . , PUTZ C.** – Immunology labelling of *beet necrotic yellow vein virus* particles inside its fungal vector, *Polymexa betae*. INRA

**SCHANFELE WR ., BUCHSE A., BUTTNER G. , MUNZEL L . (1995)** – Possibility to improve the field diagnosis for rhizomania. *Zuckerindustrie* 120, 294-298.

**SUKLACHEVA E. , NOVIKOV V., PLAKSIN D., PAVLOVA I., AMBOSOVA S. (1996)** – Highly sensitive immunoassays for detection of barley stripe mosaic virus and *beet necrotic yellow vein virus*. *Journal of virological methods* 56, 199-207.

**TORRANCE L., PEAD MT ., BUXTON G .** Production and some characteristics of monoclonal antibodies against *beet necrotic yellow vein virus*. *Laboratory MAFF Harpenden, Hatching green, Harpenden, Herts AL5 ; 2BD*

**PROTOCOLE OEPP PM7/30 (2) 2006 OEPP/EPPO**, *Beet necrotic yellow vein virus* (benyvirus). Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 36, 429–440

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](mailto: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](http://www.agriculture.gouv.fr)**

auprès de qui toute autre correspondance peut être adressée.