

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA 069- Version 01

Avril 2023

Détection du *Tomato ring spot virus* (ToRSV) par technique sérologique ELISA sur plantes hôtes

Laboratoire de la Santé des Végétaux

Laboratoire national de référence « Autres virus »

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

Historique de la méthode

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

Une modification est qualifiée de majeure lorsqu'elle concerne le processus analytique, le domaine d'application ou des points critiques de la méthode, dont la prise en compte peut modifier les performances de la méthode d'analyse et/ou les résultats. Une modification majeure induit des adaptations. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation, totale ou partielle.

Une modification est qualifiée de mineure si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Une modification mineure est sans influence sur les performances de la méthode et ne requiert pas une nouvelle validation.

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

| Version | Nature des modifications (majeure/mineure) | Date | Principales modifications |
|-----------------------|--|---------------|---|
| VH/06/13 version a | | Novembre 2004 | Version initiale sur plante hôte Pélargonium |
| MA069 v1 * | Majeure | Mai 2023 | Elargissement à l'ensemble des plantes hôtes du ToRSV, Caractérisation et validation d'une méthode DAS-ELISA (rapport avril 2022) avec recommandation du kit complet Agdia® |

* La version 1 a fait l'objet d'une consultation du 24/01/2023 au 24/03/2023 sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.

Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

Anses - Laboratoire de la Santé des Végétaux– Unité de Bactériologie, Virologie, OGM

Laboratoire National de Référence (LNR) « Autres virus ».

Adresse :

7 rue Jean Dixméras

49044 ANGERS Cedex 01

France

Tèl. : +33(0)2.41.20.74.20

Contact : lsv.ubvo@anses.fr

La présente méthode a été initialement développée par le Laboratoire National de la Protection des Végétaux de Montfavet (84) en 2004 puis modifiée par l'unité de Bactériologie, virologie, OGM du laboratoire de la santé des végétaux de l'ANSES (49).

La présente méthode est une version révisée de la VH/06/13 version a « Végétal : Pelargonium spp. Détection du Tomato ringspot nepovirus (ToRSV) par technique sérologique ELISA. ».

Le travail de relecture a été effectué par l'Unité de Coordination de la Référence du Laboratoire de la Santé des Végétaux.

Sommaire

| | |
|---|-----------|
| Avant-propos | 3 |
| Introduction | 6 |
| Avertissements et précautions de sécurité | 8 |
| 1. Objet et domaine d'application | 9 |
| 2. Documents de référence | 9 |
| 3. Termes, sigles et définitions | 9 |
| 4. Principe de la méthode | 9 |
| 5. Réactifs | 11 |
| 5.1 Eau..... | 11 |
| 5.2 Réactifs sérologiques | 11 |
| 5.3 Tampons | 11 |
| 5.4 Autres réactifs et consommables..... | 12 |
| 5.5 Contrôles..... | 12 |
| 6. Appareillage et matériels | 13 |
| 6.1 Broyeur..... | 13 |
| 6.2 Spectrophotomètre | 14 |
| 7. Échantillons | 14 |
| 7.1 Conditions d'acceptation des échantillons | 14 |
| 7.2 Conservation des échantillons avant analyse | 14 |
| 7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse..... | 14 |
| 8. Mode opératoire | 15 |
| 8.1 Préparation des échantillons pour analyse | 15 |
| 8.2 Plan de plaque | 15 |
| 8.3 Broyage..... | 15 |
| 8.4 Déroulement du test | 16 |
| 9. Résultats | 16 |
| 9.1 Contrôle de la validité des résultats | 16 |
| 9.2 Calculs et expression des résultats | 16 |
| 9.2.1 Calcul des seuils | 16 |
| 9.2.2 Interprétation..... | 17 |

| | |
|---|-----------|
| 10. Caractéristiques de performance de la méthode..... | 18 |
| Annexe 1..... | 19 |
| Bibliographie..... | 20 |

Introduction

Le Tomato ring spot virus (ToRSV) est un virus phytopathogène de la famille des Secoviridae. Il appartient au genre Nepovirus (Price, 1936). Le genre Nepovirus se divise en trois sous-groupes A, B et C qui diffèrent selon leur structure génétique et notamment la taille de leur ARN2. Les trois sous-groupes diffèrent également par les sites de clivage reconnus par leur protéinase. Le ToRSV appartient au sous-groupe C.

Une étude a montré que sur le plan sérologique, le ToRSV peut être classé en 5 sous-groupes différents dont le groupe « Chickadee » qui peut ne pas être détecté par l'ensemble des antisera disponibles (Bitterlin, M.W., 1988).

Le ToRSV attaque une large gamme de plantes-hôtes herbacées ou ligneuses. Le soja, les cucurbitacées, l'aubergine, le piment/poivron sont les plus sensibles. Ses hôtes majeurs sont le géranium zonal, le pêcher et le framboisier (OEPP, 16/03/21).

Il est transmis mécaniquement et par le nématode *Xiphinema americanum* (adultes et larves) mais aussi *X. bricolensis*, *X. californicum*, *X. intermedium*, *X. rivesi* et *X. tarjanensei*. *Thrips tabaci* peut le transmettre au soja. Les pucerons peuvent disséminer le virus à l'intérieur d'une parcelle (OEPP, 16/03/2021).

Il est signalé comme transmissible par la semence pour le fraisier, le concombre et le soja (OEPP, 16/03/2021)

Les symptômes observés sont variables selon les plantes hôtes avec des taches annulaires ou non chlorotiques et/ou nécrotiques, mais aussi des rabougrissements, déformation en rosettes sur feuilles et déformations sur fruits qui peuvent rendre invendables les productions de fruits.

Quelques exemples de symptômes sont présentés ci-dessous (extraits de la fiche de reconnaissance SORE : https://plateforme-esv.fr/sites/default/files/2022-02/Fiche_Diagnostic_TORSV0_Tomato_ringspot_virus.pdf) :



1



2



3



4



5



6



7



8

Légendes des photos :

1. Symptômes Tomato ringspot virus sur framboisier 'Willamette' © Bob Martin (USDA)
2. Symptômes Tomato ringspot virus sur concombre. © Charles Averre (North Carolina State University)
3. Symptômes Tomato ringspot virus sur bleuets. © Luc Urbain (MAPAQ)
4. Symptômes Tomato ringspot virus sur groseillier. © USDA

5. Symptômes Tomato ringspot virus sur pelargonium. © Penn State (Department of Plant Pathology & Environmental Microbiology Archives)
6. Symptômes Tomato ringspot virus sur soja. © K. Black (Dept. of Plant Pathology, PSU)
7. Symptômes Tomato ringspot virus sur vigne. © Elwin Stewart (Dept. of Plant Pathology, PSU)
8. Symptômes Tomato ringspot virus sur tomate. © Gerald Holmes (Strawberry Center, Cal Poly San Luis Obispo).

Avertissements et précautions de sécurité

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

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

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

1. Objet et domaine d'application

Cette méthode sérologique ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) s'applique à la détection en routine sur feuilles de plantes hôtes du *Tomato ring spot virus* (ToRSV).

Elle doit être utilisée en respectant les recommandations de la méthode générale MOA 008 « Techniques ELISA en bactériologie / virologie » dans sa version en vigueur.

Cette méthode est qualitative, elle permet de détecter la présence du ToRSV dans la limite du seuil de détection de la technique employée mais ne permet pas de quantifier la cible dans l'échantillon analysé, ni d'identifier le sous-groupe présent.

2. Documents de référence

- [1] MOA 008 : Techniques ELISA Bactériologie /Virologie qui fixe les principes généraux de réalisation des analyses de dépistage ou d'identification des organismes nuisibles pour les végétaux à l'aide de la technique ELISA.
- [2] Rapport de caractérisation et de validation pour la détection du Tomato ring spot virus (ToRSV) par méthode sérologique ELISA sur plantes hôtes - v1 (janvier 2023).

3. Termes, sigles et définitions

Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans la présente méthode d'analyse 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 de la méthode d'analyse.

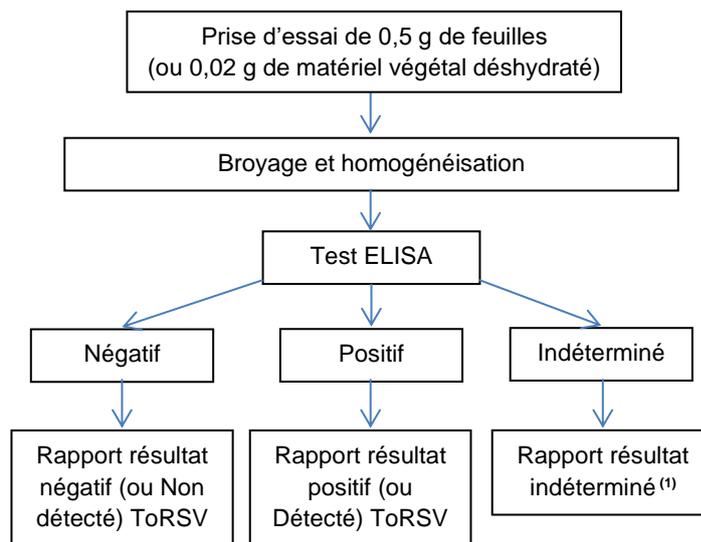
4. Principe de la méthode

La technique sérologique ELISA repose sur une réaction de reconnaissance antigène – anticorps révélée à l'aide d'une réaction enzymatique de dégradation colorée d'un substrat. L'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie via l'absorbance du milieu réactionnel (DO = densité optique). Cette absorbance est d'autant plus élevée que la concentration en hydrolysate du substrat est importante.

Bien que produisant une valeur chiffrée (absorbance), il s'agit d'une méthode qualitative donnant une réponse présence / absence de l'organisme cible recherché. Dans certains cas, une réponse indéterminée peut être obtenue.

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

Le schéma de la méthode est présenté ci-dessous :



(1) Possibilité d'effectuer un nouveau test ELISA avec le même sérum afin d'essayer de statuer sur un résultat indéterminé.

5. Réactifs

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

En règle générale, 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 contaminations ou de tout autre élément pouvant impacter le résultat.

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

5.1 Eau

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

5.2 Réactifs sérologiques

Le laboratoire utilisera les réactifs sérologiques spécifiques du ToRSV commercialisés par le fournisseur Agdia (référence : SRA22001). En effet, ces réactifs ont été caractérisés et validés lors de l'étude menée par le LSV en 2021 et 2022 et sont ceux ayant obtenus les meilleures performances. D'autres réactifs peuvent être utilisés à condition que leurs performances soient au moins égales à celles des réactifs utilisés pour la validation (cf. § 10 – Caractéristiques de performance de la méthode).

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

5.3 Tampons

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

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

Les solutions ou tampons recommandés doivent être ceux du fournisseur des réactifs sérologiques (Agdia référence : ACC 00113) ou à défaut des solutions ou tampons strictement identiques dans leur formulation.

Les préparations de tampons et solutions et leur durée et conditions de conservation doivent en tout point être conformes aux recommandations du fournisseur.

5.4 Autres réactifs et consommables

Plaques de microtitration (et couvercles): Utiliser les plaques recommandées par le fournisseur de réactifs ou 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: Pour un marquage à la phosphatase alcaline (le plus fréquent), le substrat est le p-Nitrophényl Phosphate (pNPP) du fournisseur de réactifs ou équivalent, à diluer dans du tampon de substrat selon les consignes du fournisseur.

Produit détergent désinfectant adapté: Hypochlorite de sodium à 1% de chlore actif (m/v) (ou autre produit équivalent) pour la désinfection des surfaces de travail et du matériel.

5.5 Contrôles

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 de :

- Témoins sains (TS)

Il convient d'utiliser un témoin sain de même nature (feuilles) et même matrice (végétal, espèce, variété,...) que les échantillons analysés. Il est préférable que la forme d'utilisation soit identique à celle de l'échantillon : fraîche, congelée ou lyophilisée. En cas de difficulté à trouver un témoin sain identique à l'échantillon analysé ou en cas d'échantillons trop différents à analyser en même temps, il est possible d'utiliser le témoin sain proposé par le fournisseur de réactifs.

Le témoin sain est traité en parallèle et selon les mêmes conditions que les échantillons à analyser. Il doit être déposé dans 3 fois 2 puits consécutifs au minimum.

Si possible, traiter le témoin sain avant les témoins malades. Ce témoin sain servira à déterminer le seuil de positivité.

- Témoins malades (TM)

Les témoins malades 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 soit des témoins commerciaux lyophilisés à préparer selon les recommandations du fournisseur. En complément d'un témoin malade (TM) à concentration virale élevée, il est possible 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.

Au moins un témoin malade, déposé dans deux puits, doit être utilisé.

- 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.

Au moins un témoin tampon, déposé dans deux puits, doit être utilisé.

- **Témoins substrat** (appelés également puits substrat).

Il s'agit d'un contrôle du bruit de fond généré par le substrat seul. Chaque puits est rempli d'eau de qualité analytique à chaque étape de dépôt, excepté à la dernière étape où ils sont remplis de la solution de substrat. La première colonne des plaques de microtitration peut être utilisée.

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.

6. Appareillage et matériels

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

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

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

| Grandeur | EMT |
|-------------|---|
| Volume | Volume < 10 mL : EMT = $\pm 10\%$ Volume ≥ 10 mL : EMT = $\pm 5\%$ ou se référer à la norme ISO 8655 (version en vigueur). |
| Masse | EMT = $\pm 10\%$ |
| pH | EMT = $\pm 0,3$ unité pH |
| Température | Incubateur : EMT = $\pm 3^{\circ}\text{C}$ Réfrigérateur : 5°C et EMT = $\pm 4^{\circ}\text{C}$ Congélateur : $\leq -18^{\circ}\text{C}$ |
| Temps | EMT = $\pm 10\%$ |

6.1 Broyeur

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

tout autre procédé de broyage permettant d'obtenir des résultats équivalents peut également être utilisé.

6.2 Spectrophotomètre

La méthode a été caractérisée et validée sur un spectrophotomètre de type Multiskan GO de chez Thermo Scientific. Tout autre spectrophotomètre adapté techniquement et métrologiquement à la lecture de microplaques ELISA peut être utilisé à la condition de vérifier régulièrement sa conformité métrologique en termes de justesse, de répétabilité et de linéarité.

7. Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Les échantillons reçus pour analyse doivent être dans un bon état de conservation, c'est-à-dire, ni desséchés, ni nécrosés ni en cours de décomposition et en quantité suffisante pour la prise d'essai. Dans les cas contraires, le laboratoire émet des réserves à réception en précisant la raison. Si les échantillons arrivent dans un état trop 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.

Pour les échantillons déshydratés (échantillons lyophilisés ou déshydratés), ils doivent être complètement déshydratés (sans développement de moisissures et conditionnés dans un conditionnement étanche à l'air).

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

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

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

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

7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

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'au dixième jour ouvrable minimum 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.

8. Mode opératoire

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

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

Sur matériel frais : Prélever de préférence sur les feuilles présentant des symptômes de type taches annulaires ou encore une mosaïque, un jaunissement ou un rabougrissement afin de disposer de deux prises d'essai de 0,5 g, en respectant la meilleure homogénéité possible entre les prises d'essai. La première prise d'essai servira à l'analyse, la deuxième à une éventuelle analyse ultérieure. Les prises d'essai doivent être congelées si l'analyse n'est pas réalisée rapidement (Cf paragraphe 7.2)

Sur matériel lyophilisé : Après homogénéisation du lyophilisat, prélever 0,02 g sur au moins une prise d'essai. Conserver le reliquat pour une analyse complémentaire si besoin à température ambiante, au réfrigérateur à +5°C ou au congélateur à une température inférieure à -18°C.

Quel que soit le matériel végétal analysé, la prise d'essai est mise dans un sachet de broyage (type Bioreba).

8.2 Plan de plaque

Les puits de bordure ne sont pas utilisés (phénomènes aléatoires observés modifiant l'absorbance). Ils sont remplis d'eau de qualité analytique 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 au moins 2 puits 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, sont déposés sur deux puits.

Deux puits au minimum sont réservés au témoin tampon de broyage.

8.3 Broyage

Broyer le matériel végétal au ratio 1 :10 selon les recommandations du fournisseur de réactifs sérologiques, (soit : 0,5g de matériel végétal frais ou congelé ou 0,02g de matériel végétal lyophilisé pour 5mL de tampon) dans le tampon de broyage préconisé par le fournisseur de réactifs, 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°C dans l'attente d'un résultat définitif. Ils pourront servir à une éventuelle confirmation.

8.4 Déroulement du test

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

Pour toutes les étapes de coating, dépôt des extraits, conjugué et substrat, ainsi que pour les lavages entre chaque étape, le protocole du fournisseur de réactifs (Agdia, version en cours¹) doit être scrupuleusement suivi en terme de volume, dilutions et incubations sauf pour la phase de substrat ou la durée d'incubation doit être prolongée d'une heure afin d'améliorer la sensibilité analytique de ce test ELISA.

9. Résultats

9.1 Contrôle de la validité des résultats

L'observation et la conformité à l'attendu des résultats obtenus sur les témoins décrits au §5.5 sont un préalable à l'interprétation des résultats obtenus sur les échantillons soumis à analyse.

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 sont vérifiés.

9.2 Calculs et expression des résultats

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

9.2.1 Calcul des seuils

Les densités optiques utilisées pour calculer les différents seuils sont les densités optiques brutes de lecture obtenues à l'aide du spectrophotomètre (TS : témoin sain ; MTS : moyenne de l'absorbance des puits du témoin sain).

- **Seuil 1 : S1**
 $S1 = \text{MTS} \times 2$
- **Seuil 2 : S2**
 $S2 = \text{MTS} \times 3$

¹ Méthode validée avec le kit Agdia ACC 00113, protocole fournisseur m242.4 révisé le 12/18/2019

9.2.2 Interprétation

Pour chaque échantillon, la valeur retenue est la moyenne des densités optiques brutes obtenues dans les deux puits (DO_{moy}). Cette valeur est comparée aux deux seuils définis. Le responsable technique doit toutefois vérifier l'absence d'écart important entre les répétitions d'un même échantillon et évaluer la nécessité de renouveler l'analyse.

- **Négatif** : $DO_{moy} \leq S1$

Le résultat peut être formulé de la façon suivante : ***Tomato ring spot virus (ToRSV) non détecté dans l'échantillon analysé,***

- **Indéterminé** : $S1 < DO_{moy} < S2$

Le résultat peut être formulé de la façon suivante : **Résultat sérologique indéterminé selon les limites de la méthode de détection utilisée.**

- **Positif** : $DO_{moy} \geq S2$

Le résultat peut être formulé de la façon suivante : ***Tomato ring spot virus (ToRSV) détecté dans l'échantillon analysé.***

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 du même antiserum si nécessaire.

10. Caractéristiques de performance de la méthode

- Les caractéristiques de performance de la méthode ont été évaluées lors de l'étude menée par le LSV qui a donné lieu au « Rapport de caractérisation et de validation pour la détection du *Tomato ring spot virus* (ToRSV) par méthode sérologique ELISA sur plantes hôtes - v1 ».
- Les caractéristiques de performance de la méthode présentée ci-dessous sont extraites de ce rapport pour les résultats obtenus avec le kit de détection du fournisseur Agdia après deux heures d'incubation du substrat :

| Caractéristique | Paramètre | Valeur ou résultat obtenu lors de la caractérisation | Principales informations relatives aux modalités de réalisation de la caractérisation |
|-------------------------------|--|--|---|
| Inclusivité | Pourcentage de détection parmi les cibles | 70% si les indéterminés sont considérés négatifs 80% si les indéterminés sont considérés positifs | 10 échantillons testés sur trois réplicats contenant la cible ToRSV dont 2 échantillons contenant la souche Chickadee et sur 8 matrices différentes (cerisier, pêcher, pélagonium, framboisier, vigne, tabac, chénopode, concombre). |
| Exclusivité | Pourcentage de non détection parmi les non-cibles | 100% | 21 échantillons testés en duplicats dont 8 contenant une cible proche appartenant au groupe népovirus A ou B et 10 échantillons sains sur 14 matrices différentes (vigne, pêcher, cerisier, tabac, pélagonium, concombre, prunier, amandier, merisier, framboisier, pommier et poirier) |
| Répétabilité | Pourcentage de réponse identique entre réplicats | 100% | Moyenne des résultats de répétabilité obtenus pour l'inclusivité sur les 3 réplicats des 10 échantillons testés et pour l'exclusivité sur les duplicats des 21 échantillons testés |
| Sensibilité analytique | Niveau de détection observé pour une probabilité de détection à 100% | 1.10^{-2} (Chickadee) à 4.10^{-4} | 2 échantillons positifs issus des tests d'inclusivité dont un avec la souche Chickadee, testés sur 5 niveaux de dilution (1.10^{-2} à 2.10^{-4}) sur 6 répétitions par échantillon et niveau de dilution. |

Annexe 1

Exemple de plan de plaque type à utiliser :

| | 1 ^{re} | 2 ^{de} | 3 ^{de} | 4 ^{de} | 5 ^{de} | 6 ^{de} | 7 ^{de} | 8 ^{de} | 9 ^{de} | 10 ^{de} | 11 ^{de} | 12 ^{de} |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | TS | Ech-3 | Ech-6 | Ech-9 | Ech-11 | Ech-13 | Ech-16 | Ech-19 | Ech-22 | TS | |
| C | | TS | Ech-3 | Ech-6 | Ech-9 | Ech-11 | Ech-13 | Ech-16 | Ech-19 | Ech-22 | TS | |
| D | | Ech-1 | Ech-4 | Ech-7 | TS | Tr | Ech-14 | Ech-17 | Ech-20 | Ech-23 | Tr | |
| E | | Ech-1 | Ech-4 | Ech-7 | TS | Tr | Ech-14 | Ech-17 | Ech-20 | Ech-23 | Tr | |
| F | | Ech-2 | Ech-5 | Ech-8 | Ech-10 | Ech-12 | Ech-15 | Ech-18 | Ech-21 | Tr | TM1 | |
| G | | Ech-2 | Ech-5 | Ech-8 | Ech-10 | Ech-12 | Ech-15 | Ech-18 | Ech-21 | Tr | TM1 | |
| H | | | | | | | | | | | | |

Bibliographie

- Bitterlin, M. W. « Serological Grouping of Tomato Ringspot Virus Isolates: Implications for Diagnosis and Cross-Protection ». *Phytopathology* 78, no 3 (1988): 278. <https://doi.org/10.1094/Phyto-78-278>.
- OEPP, EPPO Global Database; Tomato ringspot virus (TORSV0) – consultation du 16 mars 2021
- Price WC, 1936. Specificity of acquired immunity from tobacco ring-spot diseases. *Phytopathology*, 26:665-675
- Méthode officielle d'analyse. MOA008 version 1a, Techniques ELISA Bactériologie / Virologie