

**Méthode d'analyse en santé des végétaux**

**RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA 008- Version 1**

Consultation

# Techniques ELISA - Virologie

**Laboratoire de la santé des végétaux**

Laboratoire national de référence [Tous mandats en santé des végétaux]

## 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
MOA 008 v1a		Oct 2010	
MA008 v1	mineure	XXXX	Mise au format de méthode Anses Clarification des conditions de validation de serum Révision du vocabulaire technique Révision de la description de certaines opérations selon l'évolution des pratique

La version 1 de la méthode MA008 a fait l'objet d'une consultation du **XX/XX/2023 au XX/XX/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 Bactériologie, Virologie et détection des OGM**

Laboratoire National de Référence tous virus sauf exceptions mentionnées dans l'arrêté de nomination des LNR dans le domaine de la santé publique vétérinaire et phytosanitaire

Adresse : 7 rue Jean Dixméras – 49044 ANGERS cedex 01

Contact : [lsv.ubvo@anses.fr](mailto:lsv.ubvo@anses.fr)

### **Anses - Laboratoire de la santé des végétaux – Unité de Quarantaine**

Laboratoire National de Référence virus de la Sharka (PPV), virus de la pomme de terre et virus sur agrumes

Adresse : 6 rue Aimé Rudel - Marmilhat - 63370 LEMPDES

Contact : [clermont.lsv@anses.fr](mailto:clermont.lsv@anses.fr)

### **Anses - Laboratoire de la santé des végétaux – Unité Ravageurs et agents pathogènes tropicaux**

Laboratoire National de Référence virus sur bananier et plantes tropicales

Adresse : 7, chemin de l'Irat 97410 SAINT-PIERRE/ Ile de La Réunion

Contact : [saint-pierre.lsv@anses.fr](mailto:saint-pierre.lsv@anses.fr)

## Sommaire

<b>Avant-propos</b> .....	<b>3</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>6</b>
<b>Avertissements et précautions de sécurité</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Objet et domaine d'application</b> .....	<b>8</b>
<b>2. Documents de référence</b> .....	<b>9</b>
<b>3. Termes, sigles et définitions</b> .....	<b>9</b>
<b>4. Principe de la méthode</b> .....	<b>9</b>
<b>5. Réactifs</b> .....	<b>11</b>
5.1 Antisera .....	12
5.1.1 Choix du fournisseur par le laboratoire utilisateur .....	12
5.1.2 Contrôles effectués par le laboratoire utilisateur .....	12
5.2 Tampons .....	14
5.3 Plaques de microtitration .....	14
5.4 Substrat de l'enzyme .....	14
5.5 Autres consommables .....	14
<b>6 Appareillage et matériels</b> .....	<b>14</b>
6.1 Petit matériel .....	15
6.2 Gros matériel.....	15
<b>7 Contrôles et témoins (références de lecture)</b> .....	<b>16</b>
7.1 Référence de lecture de l'absorbance (puits substrat).....	16
7.2 Contrôle positif (témoin malade : TM).....	16
7.3 Contrôle négatif (témoin sain : TS) .....	17
7.4 Référence tampon d'extraction (Tp).....	18
<b>8 Mode opératoire</b> .....	<b>18</b>
8.1 Plan de plaque .....	18
8.2 Dépôt des anticorps de capture (coating) .....	18
8.2.1 Dépôt.....	18
8.2.2 Incubation .....	19
8.2.3 Lavages .....	19
8.3 Dépôt des extraits.....	20

8.3.1 Dépôt .....	20
8.3.2 Incubation .....	20
8.3.3 Lavages .....	20
8.4 Dépôt des anticorps conjugués.....	20
8.4.1 Dépôt .....	20
8.4.2 Incubation .....	21
8.4.3 Lavages .....	21
8.5 Dépôt du substrat .....	21
8.5.1 Dépôt .....	21
8.5.2 Incubation .....	21
8.6 Autres étapes éventuelles complémentaires.....	21
<b>9 Résultats .....</b>	<b>22</b>
9.1 Contrôle de la validité des résultats .....	22
9.1.1 Lecture des plaques de microtitration.....	22
9.1.2 Vérification de l'interprétabilité des résultats avant exploitation des valeurs d'absorbance .....	23
9.2 Interprétation et formulation des résultats.....	23
9.2.1 Critères d'interprétation des valeurs d'absorbance : détermination de seuils.....	23
9.2.2 Détermination et formulation du résultat d'analyse.....	25
<b>10 Elimination des matériels susceptibles d'être contaminants .....</b>	<b>26</b>
<b>11 Conservation des reliquats de matériels utilisés.....</b>	<b>26</b>
<b>Annexe – Exemple de plan de plaque .....</b>	<b>28</b>

## Introduction

La présente méthode s'inscrit dans le cadre de la réalisation d'analyses officielles en santé des végétaux. Elle fixe les principes généraux de réalisation des analyses de détection ou d'identification des organismes nuisibles pour les végétaux à l'aide de la technique ELISA dans le domaine de la virologie végétale. Elle encadre les préconisations des méthodes spécifiques pour la mise en œuvre de test ELISA.

Cette méthode est issue d'une révision de la méthode MOA008 v1a qui avait été élaborée par le Laboratoire National de la Protection des Végétaux (LNPV) et plus précisément par la station d'Angers du LNPV avec l'aide de la station de quarantaine de Clermont-Ferrand et de la station de la Réunion.

## **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.**

## 1. Objet et domaine d'application

La présente méthode fixe les principes généraux de réalisation des analyses de détection ou d'identification des organismes nuisibles pour les végétaux à l'aide de la technique ELISA.

Les méthodes officielles par matrice et organisme pathogène ou, à défaut, les fournisseurs de réactifs sérologiques, fixent les exigences spécifiques complémentaires à mettre en œuvre pour la réalisation pratique des analyses, notamment :

- la nature et la préparation de l'échantillon pour analyse,
- la nature et la réalisation de la prise d'analyse,
- l'extraction des antigènes (fragmentation, broyage, macération, ...),
- les modes de conservation du matériel végétal et de l'extrait.

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

- l'ambiance générale des locaux (température, propreté, ...),
- le "savoir faire" (pipetage, manipulation des plaques de microtitration, méthode de lavage lorsque celle-ci est manuelle, ...),
- la recommandation d'utilisation d'un antiserum ou de consommables spécifiques,
- la mention des conditions de validation de la méthode (incluant les réactifs ayant donné les résultats de performance adaptés)
- les seuils de détection.

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

Toutes les analyses de détection des virus des végétaux faisant appel à la technique ELISA ou ses dérivées sont concernées par la présente méthode.

A noter, 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 de son 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.

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

Les particularités des objets soumis à essais (nature, stade physiologique,...) et la taille des échantillons sont définies dans les méthodes spécifiques ou tout autre document prescriptif en la matière. Les spécifications techniques relatives à l'analyse proprement dite sont précisées dans les méthodes officielles par matrice/hôte pathogène.



## Grandeur de l'objet soumis à analyse.

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

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

Le délai maximum entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse ainsi que la température et autres conditions de conservation des échantillons sont définies dans les méthodes officielles spécifiques voire dans les notes de services publiées par le ministère chargé de l'agriculture.

## 2. Documents de référence

- [1] AFNOR. Norme NF U47-302 (octobre 2002). Protocole de contrôle des réactifs pour la recherche des anticorps dirigés contre le virus de la leucose bovine enzootique par la méthode ELISA dans des sérums (mélange ou individuels)
- [2] AFNOR. Norme NF U47 - 019 (2010) : Guide de bonnes pratiques pour la mise en œuvre des techniques ELISA
- [3] EPPO. PM 7/125(1) ELISA tests for viruses. (2015). Bulletin OEPP/EPPO 45(3), 445–449. DOI: 10.1111/epp.12259

## 3. Termes, sigles et définitions

Afin d'éviter toute mauvaise 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 MOA GLO 001 reprend les principales définitions. L'attention des lecteurs est attirée sur le fait que les termes intégrés au glossaire ne sont, en règle générale, pas spécifiquement repérés dans le corps de la méthode d'analyse. Les sigles sont explicités au fur et à mesure du texte

## 4. Principe de la méthode

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

Les techniques immuno-enzymatiques utilisent le principe d'une réaction immunologique, suivie d'une réaction enzymatique de dégradation d'un substrat. Au cours de cette réaction, un anticorps (immunoglobuline Ig) reconnaît spécifiquement un antigène (Ag) et s'y fixe. Les immunoglobulines sont purifiées à partir du sérum

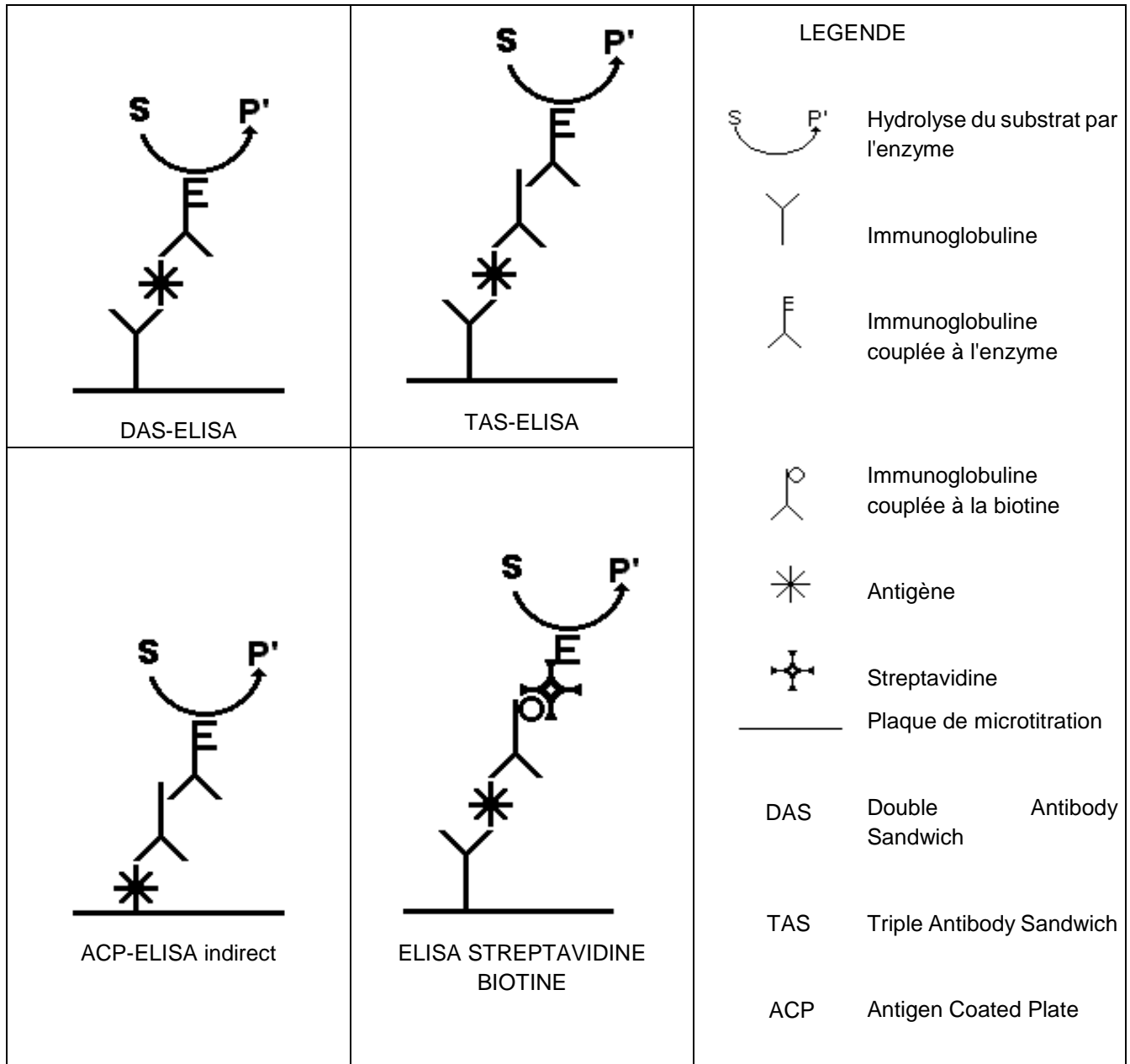
d'un animal préalablement immunisé contre cet antigène ou à partir d'une culture cellulaire. Des anticorps recombinants du type Fab (Fragment antibody) ou SCFV (Single Chain Fragment Variable) peuvent être utilisés.

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

Des variantes de cette méthode existent :

- adsorption directe des antigènes sur les plaques (ACP) ;
- nécessité d'utiliser un anticorps supplémentaire (TAS), (cf. Figure 1 ci-dessous) ;
- méthodes compétitives...

**Figure 1:** les constructions les plus souvent utilisées en phytopathologie sont des méthodes non compétitives basées sur les principes suivants :



## 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 à l'absence dans l'eau, produits et consommables utilisés, de contamination, d'inhibiteur ou de tout autre élément pouvant interférer sur le résultat. L'utilisation de produits et consommables certifiés, le nettoyage, la désinfection ou tout autre traitement approprié concourent également à cette absence d'interférence.

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 et justifiera les conditions qu'il jugera les plus optimales.

## 5.1 Antisera

### 5.1.1 Choix du fournisseur par le laboratoire utilisateur

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

- des informations techniques disponibles dont celles de la méthode officielle ;
- des résultats d'une évaluation de réactifs réalisée par le LNR
- des critères de performance des réactifs ou de la capacité des réactifs à atteindre les critères de performance de la méthode officielle (ex : sensibilité et spécificité) lorsqu'ils sont précisés par le fournisseur et vérifiés par le laboratoire;
- de la capacité du fournisseur à donner des informations concernant l'identification, le stockage, le mode d'emploi et les contrôles qualité internes de ses réactifs ;

*Conservation : respecter les préconisations du fabricant.*

### 5.1.2 Contrôles effectués par le laboratoire utilisateur

Le contrôle des antisera sera réalisé avant l'utilisation effective des produits ou parallèlement à leur première utilisation et selon les conditions décrites dans le tableau 1.

Tableau 1 – Condition de contrôle de sérum par le laboratoire utilisateur

Modalité de contrôle	Situation	Critère de validation
1	Toutes situations	La valeur des critères de performance de sensibilité et de spécificité, telle que définie dans les données de performance de la méthode d'analyse ou sur demande auprès du LNR, est atteinte ou supérieure.
2	Autre sérum : autre que celui indiqué dans la méthode officielle	La valeur des critères de performance de sensibilité et de spécificité, telle que définie dans les données de performance de la méthode d'analyse ou sur demande auprès du LNR, est atteinte ou supérieure.

		Le seuil de détection est similaire ou inférieur à celui obtenu au cours de l'essai de contrôle avec le sérum utilisé précédemment.
3	Sérum indiqué dans une méthode officielle (nouveau lot)	<p>Concordance de statut pour tous les résultats.</p> <p>Pour la gamme de dilutions, il y a possibilité de résultats positifs avec le nouveau lot et négatif avec l'ancien lot (meilleure performance du nouveau lot)</p>

### Modalités de contrôles :

**Modalité 1 :** Réaliser les analyses en utilisant des matériaux de référence positifs et négatifs, si possible du matériel végétal infecté (TM) et non infecté (TS), traités selon les prescriptions de la méthode officielle.

Dans ce cas, il convient de réaliser *a minima* l'évaluation sur :

- 7 échantillons contenant la cible (échantillons naturellement ou artificiellement contaminés, souches en suspension,...) et si possible incluant différents isolats ou souches de cette cible ;
- 7 échantillons ne contenant pas la cible dont 3 sains (représentatifs de la diversité d'hôtes de la cible en rapport avec les analyses réalisées au laboratoire) et 4 contaminés avec des organismes non cibles. (virus potentiellement présents dans la même matrice ou bactéries issues de la flore saprophyte de la même matrice) ;
- 2 gammes de dilutions (5 dilutions au minimum par gamme) issues de matériaux de référence positifs si possible différents afin d'évaluer le seuil de détection (absolu ou relatif).

**Modalité 2 :** Réaliser des analyses en comparant les résultats obtenus simultanément (en même temps) avec le nouvel *antiserum* et celui utilisé précédemment (à condition qu'il ne soit pas périmé), en suivant les préconisations de la méthode spécifique hôte/pathogène ou tout autre document prescriptif.

Dans ce cas, le contrôle se fera, sauf impossibilité lié au volume d'analyses,

- *a minima* sur 10 échantillons de statut connu incluant des échantillons cibles et non cibles représentatifs des cibles et des non-cibles analysées au laboratoires
- et deux gammes de dilutions (5 dilutions au minimum par gamme) issues de deux matériaux de référence positifs si possible différents afin d'évaluer le seuil de détection (absolu ou relatif)

**Modalité 3 :** Réaliser des analyses en comparant les résultats obtenus simultanément (en même temps) avec le nouveau lot d'*antiserum* et celui utilisé précédemment (à condition qu'il ne soit pas périmé), en suivant les préconisations de la méthode spécifique hôte/pathogène ou tout autre document prescriptif.

Dans ce cas, le contrôle se fera *a minima* sur :

- 3 échantillons de statut connu, incluant des échantillons cibles et non cibles représentatifs des cibles et des non-cibles analysées au laboratoires
- une gamme de dilution (5 dilutions au minimum) préparée à partir d'un matériau de référence positif.

Remarque : dans tous les cas, les gammes de dilutions testées devront encadrer le seuil de détection (des résultats positifs et négatifs doivent être obtenus).

## 5.2 Tampons

Utiliser les tampons et suivre les recommandations de conservation prescrits dans la méthode officielle, ou à défaut ceux prescrits par le fournisseur. Si le laboratoire utilise d'autres tampons, il devra confirmer que les performances de l'essai ne sont pas dégradées.

## 5.3 Plaques de microtitration

Pour le choix des plaques, suivre les préconisations des méthodes officielles spécifiques hôte/pathogène ou, celles du fournisseur. Si le laboratoire utilise d'autres plaques de microtitration que celles préconisées, il devra confirmer que les performances de l'essai ne sont pas dégradées.

Le stockage des plaques doit se faire selon les préconisations du fabricant. A défaut, éviter le stockage en dehors des emballages d'origine, près d'une source de chaleur ou exposé à la lumière.

## 5.4 Substrat de l'enzyme

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

## 5.5 Autres consommables

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

# 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.

Afin d'alléger la lecture des méthodes officielles, seules les valeurs cibles des grandeurs mesurées sont indiquées dans le corps du texte. Les erreurs maximales tolérées (EMT) à prendre en considération sont données dans le tableau 2 (dans le cas contraire, les spécifications sont précisées dans le texte des méthodes spécifiques).

Tableau 2 – Erreurs maximales tolérées (EMT) pour les grandeurs dans le cadre de la mise en œuvre de tests ELISA

Volume	volume < à 10 mL : EMT = ± 10%	14 / 29
--------	--------------------------------	---------

	<b>Volume <math>\geq</math> à 10 mL</b> : EMT = $\pm$ 5 % ou se référer à la norme ISO 8655 (version en vigueur).
<b>Masse</b>	EMT = 10%
<b>pH</b>	EMT = $\pm$ 0,3 u
<b>Température</b>	<b>incubateur</b> : EMT = $\pm$ 3°C <b>réfrigérateur</b> : 5°C et EMT = $\pm$ 4°C <b>congélateur</b> : $\leq$ -18°C <b>congélateur froid intense</b> : $\leq$ -65°C
<b>Longueur</b>	EMT = $\pm$ 10%
<b>Temps</b>	EMT = $\pm$ 10%
<b>Absorbance</b>	De 0 à 0,25 : +/- 0,02 unité absorbance > à 0,25 : +/- 7,5% de la valeur conventionnelle de référence du puits

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

### 6.1 Petit matériel

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

### 6.2 Gros matériel

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

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

## 7 Contrôles et témoins (références de lecture)

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

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

L'utilisation de ces références sert à valider le bon déroulement des différentes étapes de l'analyse ainsi que les résultats obtenus sur les différentes plaques. Leur observation et/ou lecture et conformité à l'attendu est un préalable à l'interprétation des résultats obtenus sur les échantillons soumis à analyse. Le traitement de ces références doit se faire dans les mêmes conditions que les échantillons testés a minima pour les témoins sains.

### 7.1 Référence de lecture de l'absorbance (puits substrat)

La référence de lecture d'absorbance correspond à la moyenne des absorbances mesurées des puits substrats (voir exemple ci-dessous). Cette mesure intègre les réactions colorées non enzymatiques (dégradation naturelle du substrat).

Cette valeur, soustraite de l'absorbance brute (i.e. mesurée par le lecteur de microplaques) des échantillons permet d'obtenir les valeurs d'absorbance corrigée(s).

Le laboratoire doit formaliser clairement le mode d'acquisition de cette valeur. Généralement, les puits substrat sont composés a minima de 6 puits de la colonne 1 de la plaque.

Exemple de réalisation des puits substrats :

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

### 7.2 Contrôle positif (témoin malade : TM)

Le TM constitue un élément de validation des analyses effectuées sur une plaque. L'obtention d'un résultat positif permet de garantir le déroulement correct de la manipulation.

Pour chaque série d'analyses, on peut soit utiliser un témoin malade lyophilisé fourni avec le kit d'analyse ou à disposition au laboratoire, soit des témoins malades broyés ou non broyés conservés congelés ou lyophilisés. Les TM peuvent également être préparés à partir de macérats artificiellement contaminés au laboratoire.



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

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

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

<i>Qualités requises pour le TM</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>. présence de l'antigène recherché en concentration suffisante pour donner un signal positif net ;</li> <li>. si possible, phase d'extraction des antigènes réalisée dans les mêmes conditions que les prises d'essai (non obligatoire).</li> </ul>

Exemple de réalisation des puits TM :

Lors de la 1<sup>ère</sup> étape "dépôt des Ig" = dépôt des Ig (coating), lors de 2<sup>ème</sup> étape "dépôt des extraits" = dépôt du TM, lors de la 3<sup>ème</sup> étape "dépôt des Ig-E" = dépôt des Ig-E (conjugué), et lors de la 4<sup>ème</sup> étape "dépôt du substrat" = dépôt du substrat.

### 7.3 Contrôle négatif (témoin sain : TS)

Un ou plusieurs matériaux de référence sains sont utilisés comme témoins négatifs. La moyenne des absorbances des témoins sains servira à déterminer le seuil de positivité.

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

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

<i>Qualités requises pour le TS</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>. absence de l'antigène recherché,</li> <li>. phase d'extraction des antigènes réalisée dans les mêmes conditions que les prises d'essai, si possible</li> <li>. matériel végétal si possible : de même espèce (ou en cas d'impossibilité même genre ou même famille), du même organe et du même stade physiologique que les prises d'essai.</li> </ul>

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

#### Exemple de réalisation des puits TS :

Lors de la 1<sup>ère</sup> étape "dépôt des Ig" = dépôt des Ig (coating), lors de la 2<sup>ème</sup> étape "dépôt des extraits" = dépôt du TS, lors de la 3<sup>ème</sup> étape "dépôt des Ig-E" = dépôt des Ig-E (conjugué), et lors de la 4<sup>ème</sup> étape "dépôt du substrat" = dépôt du substrat.

### **7.4 Référence tampon d'extraction (Tp)**

Le tampon d'extraction est la solution d'extraction des agents pathogènes.

La référence tampon d'extraction met en lumière d'éventuelles réactions enzymatiques non spécifiques liées à la manipulation (résidus de conjugué dans les puits, ...).

Comme une référence non infectée, elle constitue un élément de validation des valeurs d'absorbance obtenues sur une plaque en donnant l'assurance d'un déroulement correct de la manipulation permettant une réaction négative.

Généralement, deux puits au minimum sont réservés pour les Tp.

#### Exemple de réalisation des puits tampons :

Lors de la 1<sup>ère</sup> étape "dépôt des Ig" = dépôt d'Ig (coating), lors de la 2<sup>ème</sup> étape "dépôt des extraits" = dépôt du Tp extraction, lors de la 3<sup>ème</sup> étape "dépôt des Ig-E" = dépôt des Ig-E (conjugué), et lors de la 4<sup>ème</sup> étape "dépôt du substrat" = dépôt du substrat.

## **8 Mode opératoire**

Les exemples pris ci-dessous correspondent à la mise en œuvre d'une DAS-ELISA

### **8.1 Plan de plaque**

Établir soigneusement le plan de distribution (plan de plaque) et d'identification des extraits (voir exemple en annexe 1). Il est souhaitable d'adopter un plan standard au niveau du laboratoire.

Chaque échantillon est au moins répété ou dupliqué 1 fois soit 2 puits par échantillon. Pour les références de lecture se référer au point 6. Emploi et nature des références de lecture.

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

### **8.2 Dépôt des anticorps de capture (coating)**

#### **8.2.1 Dépôt**

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

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

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

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

### 8.2.2 Incubation

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

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

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

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

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

### 8.2.3 Lavages

*NB : Utiliser le tampon de lavage approprié.*

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

S'assurer que toute la surface des puits est lavée.

Selon le dispositif retenu, faciliter le lavage en faisant disparaître d'éventuelles bulles au fond des puits (pour se faire, tapoter efficacement les plaques sur du papier absorbant).

Ne pas laisser sécher les plaques et procéder rapidement à l'étape suivante. Si un délai est nécessaire, maintenir du tampon de lavage dans les puits.

Déroulement des étapes de lavage (cas du lavage manuel) :

1. éliminer l'excès de l'*antiserum* en renversant la plaque énergiquement, par exemple au-dessus d'un évier..
2. remplir les puits de tampon. Lors de cette étape, veiller à éviter les contaminations de cupule à cupule en procédant de manière à ce que les débordements de tampon de lavage se produisent vers des puits déjà remplis de tampon et non vers des puits vides (plaque inclinée vers le bas à 45°C avec si possible les puits TM en bas). Vider ensuite énergiquement l'excès de liquide. Au

besoin taper les plaques sur du papier absorbant afin d'éliminer au mieux le résidu de tampon de lavage.

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

## 8.3 Dépôt des extraits

### 8.3.1 Dépôt

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

Dans les puits des plaques de microtitration, déposer le volume préconisé des extraits homogénéisés selon le plan de plaque préalablement défini en utilisant une micropipette et en changeant de cône entre chaque extrait.

Si besoin, mettre les plaques de microtitration en agitation quelques secondes. Puis mettre les plaques à incuber.

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

### 8.3.2 Incubation

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

### 8.3.3 Lavages

Idem point 8.2.3.

Le lavage après incubation des extraits doit être tout particulièrement soigné ; s'assurer visuellement qu'il ne subsiste aucun reliquat de broyage dans les puits.

## 8.4 Dépôt des anticorps conjugués

### 8.4.1 Dépôt

Diluer les anticorps conjugués dans le tampon spécifique et à la concentration préconisée (par le fournisseur ou par la méthode spécifique hôte/pathogène) au moment de l'emploi.

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

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

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

## 8.4.2 Incubation

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

## 8.4.3 Lavages

Idem point 8.2.3.

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

## 8.5 Dépôt du substrat

### 8.5.1 Dépôt

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

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

Déposer la solution au fond des puits (éviter de toucher le bord supérieur et le fond des puits).

Si besoin, mettre les plaques de microtitration en agitation quelques secondes.

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

### 8.5.2 Incubation

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

## 8.6 Autres étapes éventuelles complémentaires

Selon le schéma de construction figurant dans la méthode officielle spécifique hôte/pathogène, ou d'après les données du fournisseur de réactifs, des étapes supplémentaires peuvent venir compléter ou remplacer celles décrites ci-dessus. Des étapes peuvent également être supprimées.

En fonction de la technique immunoenzymatique, la chronologie des étapes peut être modifiée, comme par exemple pour les techniques ACP où l'antigène est déposé en premier. De même et afin de réduire « le bruit de fond » certains protocoles incluent une étape de blocage au lait écrémé ou à la BSA.

## 9 Résultats

### 9.1 Contrôle de la validité des résultats

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

#### 9.1.1 Lecture des plaques de microtitration

Le lecteur de microplaques doit être régulièrement vérifié afin de satisfaire aux exigences de la méthode en terme d'exactitude des résultats de mesure.

Après une période d'incubation à la température préconisée (par la méthode officielle spécifique hôte/pathogène, ou par le fournisseur) et à l'abri de la lumière (si nécessaire) une ou plusieurs lectures sont effectuées au lecteur de microplaques à une longueur d'onde définie.

Il est bien entendu nécessaire de choisir un lecteur de microplaques adapté pour la mesure de l'absorbance à la longueur d'onde du produit issu de la réaction enzymatique sur le substrat (voir tableau 3 ci-dessous) :

Tableau 3 – Caractéristiques d'absorbance des associations enzyme / substrat

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

#### Remarques :

Avant lecture, il est impératif de bien essuyer le dessous des puits de la plaque afin d'enlever toute trace de condensation due à l'utilisation de la chambre humide et d'ôter toutes les bulles présentes dans les puits, par agitation douce par exemple. En effet la condensation présente sous les puits et la présence de bulles d'air sont de nature à modifier l'absorbance

La plupart des lecteurs de microplaques doit être mis sous tension un certain temps avant lecture (suivre les préconisations du constructeur).

### 9.1.2 Vérification de l'interprétabilité des résultats avant exploitation des valeurs d'absorbance

Un minimum d'observations préalables est nécessaire avant l'exploitation des valeurs d'absorbance

Les résultats peuvent être interprétés si aucun incident ou anomalie (cf. encadré ci-dessous) n'est constaté. Dans le cas contraire, selon la nature de ces incidents et compte tenu de son expérience, le responsable technique évalue la pertinence à interpréter tout ou partie des résultats.

#### CRITERES d'interprétabilité des plaques avant exploitation des valeurs d'absorbance des prises d'essai

##### 1 - Observation des absorbances des références :

- . les valeurs des références infectées ont atteint le niveau de réaction attendu escompté (absorbances élevées donnant un résultat clairement positif),
- . les valeurs des références non infectées ont atteint le niveau de réaction attendu escompté (absorbances basses donnant un résultat négatif),
- . les valeurs des références Tp ont atteint le niveau de réaction attendu escompté (absorbances basses donnant un résultat négatif),
- . les valeurs obtenues pour les références non infectées sont proches des valeurs de la référence tampon (NB : il peut arriver que la référence tampon soit supérieure au témoin sain bien qu'en général la situation inverse est observée ).

Remarque : la validation tient principalement compte de l'expérience propre de chaque laboratoire.

##### 2 - Distribution des valeurs d'absorbance sur la plaque ne mettant pas en évidence un gradient d'absorbances laissant suspecter une contamination à partir des TM ou d'échantillons positifs.

##### 3 - Aspects localisés :

- . absence de phénomène local, non identifiable, affectant une des répétitions de l'analyse (valeurs d'absorbance de deux répétitions d'un même échantillon présentant un écart important).

Si les critères d'interprétabilité des plaques ne sont pas respectés, l'exploitation des résultats ne pouvant avoir lieu, l'analyse doit être renouvelée, soit à partir des reliquats de broyat conservés de façon à garantir leur intégrité, soit à partir d'une nouvelle prise d'essai ou de nouveaux échantillons.

## 9.2 Interprétation et formulation des résultats

### 9.2.1 Critères d'interprétation des valeurs d'absorbance : détermination de seuils

Les seuils d'interprétation des valeurs d'absorbance sont définis dans les méthodes officielles.

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

Les formules de calcul les plus couramment utilisées pour interpréter les résultats s'appuient sur 2 seuils, mais d'autres méthodes peuvent être utilisées si elles ont été éprouvées dans le cadre de leur développement<sup>1</sup>:

- Seuil 1 (séparant les négatifs des indéterminés) :
  - o moyenne d'absorbance des échantillons non infectés additionnée de plusieurs fois leur écart type (2 en général),ou
  - o moyenne des absorbances des TS multipliée par un facteur (A1).
  
- Seuil 2 (séparant les indéterminés des positifs) :
  - o moyenne d'absorbance des échantillons non infectés additionnée de plusieurs fois leur écart type (4 en général),ou
  - o moyenne des absorbances des TS multipliée par un facteur (A2 > A1).

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

- Moy Absorbance TS + (t x Ecart Type)

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

**Ou**

- Moy Absorbance TS x A (2 en général)

Les calculs sont réalisés à partir des valeurs d'absorbance brutes ou corrigées (cf. 6.1. Référence de lecture de l'absorbance) selon les prescriptions de la méthode d'analyse.

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

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

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

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

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

---

<sup>1</sup> Notamment des méthodes statistiques basées sur des ANOVA (analyses de variances) par groupes d'échantillons **24 / 29**



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

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

#### Remarques :

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

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

Dans ce cas, un seuil de positivité, donné en valeur corrigée, par exemple 0,100 peut se substituer au seuil basé sur la moyenne des absorbances des témoins sains ;

Par ailleurs, lorsque les absorbances corrigées obtenues sont négatives (absorbance des puits substrat légèrement supérieure à celle des TS), il est possible pour ne pas avoir à considérer la valeur nulle de prendre la valeur absolue. Cette possibilité n'est laissée que dans les cas où la valeur absolue ne dépasse pas 0,010.

- Un nombre minimal de valeurs "non infectées" est nécessaire au calcul pour les formules intégrant l'écart type ; 6 est un nombre généralement admis. Pour les autres cas, le nombre minimal est de 4.

- Une appréciation visuelle de la coloration par le responsable technique, compte tenu de son expérience, est considérée comme une manière de procéder qui relève de la spontanéité, mais qui ne peut suffire en termes de reproductibilité et de traçabilité.

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

### 9.2.2 Détermination et formulation du résultat d'analyse

La méthode officielle spécifique hôte/pathogène employée peut être très sensible et notamment capable de détecter de très faibles quantités de l'antigène recherché, et/ou elle peut être "spécifique" et sera alors apte à éliminer toutes confusions entre l'antigène recherché et un antigène sérologiquement proche.

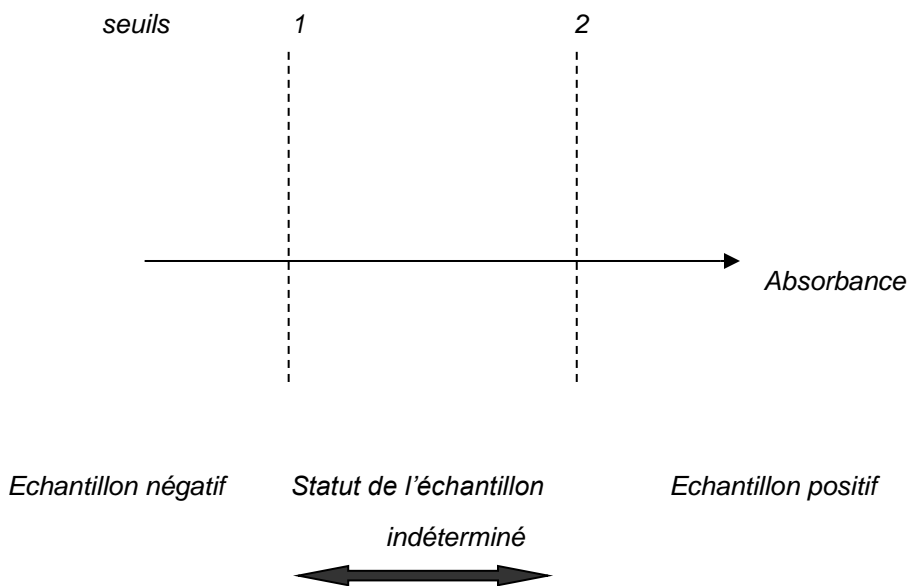
Toutefois, même optimisée, une méthode d'analyse ne garantit pas toujours un pouvoir discriminant absolu et des "faux négatifs" peuvent être engendrés si la technique n'est pas assez sensible, ou des "faux positifs" si la technique n'est pas assez spécifique.

L'un ou l'autre de ces risques peut être accepté dans certains cas, par exemple, pour satisfaire à la volonté de garantir l'absence d'un agent pathogène, on accepte le risque "faux positif". Néanmoins, il y a intérêt à pouvoir identifier au mieux les échantillons situés dans la zone intermédiaire entre "négatifs" et "positifs". Pour les qualifier, le vocable "indéterminé" est à utiliser. Le terme « douteux » est à proscrire.

Selon le contexte, la méthode officielle spécifique hôte/pathogène peut préciser la conduite à tenir face à ces difficultés d'interprétation et le recours éventuel à d'autres techniques d'analyse.

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

### Prise de décision



A titre d'exemple :

**1 Echantillon négatif** : Moy Absorbance échantillon < A1 x Moy Absorbance TS

**2 Statut de l'échantillon indéterminé** :  $A1 \times \text{Moy Absorbance TS} \leq \text{Moy Absorbance échantillon} < A2 \times \text{Moy Absorbance TS}$

## 10 Elimination des matériels susceptibles d'être contaminants

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

## 11 Conservation des reliquats de matériels utilisés

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

d'analyse concluant à la non mise en évidence de l'organisme recherché. Ce délai imposé est destiné à laisser le temps au demandeur de l'analyse de contester le résultat auprès du laboratoire (ce qui prolonge la conservation du reliquat jusqu'à l'issue de la contestation) et éventuellement de demander une analyse contradictoire.

Dans le cas d'un résultat autre que la non mise en évidence de l'organisme recherché, et sauf indications plus précises dans la méthode, l'ensemble des reliquats pertinents doit être conservé pendant une durée minimale de 12 mois ou correspondant à la durée de la période de campagne de détection de l'organisme recherché, 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.

## Annexe – Exemple de plan de plaque

Date :

PLAQUE N°:

Chargement effectué par :

ANTIGENE(S) :

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

**OBSERVATIONS :** Le "blanc" du lecteur de microplaques est réalisé sur la première colonne qui est chargée en solution substrat à la dernière étape (facultatif).

Les extraits sont doublés verticalement.

Excepté pour la colonne 1 (puits substrat), les lignes et colonnes de bordure sont remplies avec de l'eau à toutes les étapes.

Le tour d'eau n'est pas obligatoire si le système de couverture de la plaque est étanche et que le laboratoire peut prouver qu'il n'y a pas d'effet de bordure (cf. point 7.1).

