



Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV MA 029 - Version 1

Jun 2015

Détection du *Citrus tristeza virus* (CTV), virus de la tristeza sur plantes hôtes de la famille des Rutacées par la technique sérologique ELISA

Laboratoire de la santé des végétaux – Unité Ravageurs et pathogène tropicaux
Laboratoire national de référence pour la détection des virus sur plantes tropicales

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 peut être mise à jour afin de prendre en compte des modifications.

Une modification est considérée comme majeure dès lors qu'elle concerne des parties clés ou le fond même de la méthode, dont la prise en compte est susceptible d'améliorer significativement la portée ou le résultat de la méthode d'analyse. Une modification majeure induit en général des adaptations importantes. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation.

Une modification est considérée comme mineure si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Les caractéristiques de performance de la méthode ainsi améliorée ne sont pas modifiées; elle n'a pas fait l'objet d'une nouvelle validation.

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

Version	Nature des modifications	Date	Principales modifications
Version 1		Juin 2015	Version initiale (1)

Tableau 1 : Historique des versions de la présente méthode.

(1) Une consultation publique de la méthode a été organisée du 15 mars 2013 au 30 avril 2013 sur le site internet de l'Anses, et notamment auprès des laboratoires agréés français.



Avant-propos

La présente méthode s'appuie sur le protocole OEPP de diagnostic pour les organismes réglementés (PM 7/31 (1) *Citrus tristeza closterovirus*).

La méthode a été caractérisée et validée par l'unité « Ravageurs et pathogènes tropicaux » du Laboratoire de la Santé des Végétaux (LSV-RAPT), Laboratoire National de Référence (LNR) pour la détection du *Citrus tristeza virus*, avec la collaboration de l'unité de quarantaine du Laboratoire de la santé des végétaux.

Adresse : Anses - Laboratoire de la santé des végétaux – unité RAPT
3P, 7 chemin de l'IRAT, 97410 Saint-Pierre

Contact : saint-pierre.lsv@anses.fr

Les travaux méthodologiques effectués sur la méthode ont donné lieu à un rapport de validation (RF-PJ/CTV01-V1-FR, juin 2015). Le rapport de validation, ainsi que la méthode ont été revus par des pairs scientifiques (CIRAD Réunion, Laboratoire de la santé des végétaux - unité de quarantaine).



Sommaire

Avant-propos.....	3
Introduction	5
Avertissements et précautions de sécurité	6
1 Objet et domaine d'application	7
2 Documents de référence	8
3 Termes, sigles et définitions	8
4 Principe de la méthode	8
5 Réactifs	10
5.1 Eau	10
5.2 Réactifs sérologiques	10
5.3 Tampons	10
5.4 Autres réactifs et consommables	11
5.5 Contrôles et témoins	11
6 Appareillage et matériels	12
6.1 Broyeur	12
6.2 Spectrophotomètre.....	12
6.3 Mesures	13
7 Échantillons.....	13
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	13
7.2 Conservation des échantillons avant analyse.....	14
7.3 Conservation des échantillons après analyse.....	14
8 Mode opératoire	15
8.1 Préparation des échantillons pour analyse	15
8.2 Broyage de l'échantillon	16
8.3 Déroulement du test sérologique	16
9 Résultats	17
9.1 Contrôle qualité	17
9.2 Calculs et expression des résultats	17
10 Caractéristiques de performance de la méthode	19
Annexe 1 – Plan de plaque	21
Bibliographie	22



Introduction

La méthode décrite dans ce document permet de détecter spécifiquement le *Citrus tristeza virus* (CTV) qui est l'agent responsable de la maladie de la « tristeza » principal fléau de l'agrumiculture dans le monde. La plupart des espèces et cultivars du genre *Citrus* sont sensibles à ce virus qui affecte des espèces d'autres genres de la famille des Rutacées.

A la date de publication de la présente méthode, ce virus a le statut d'organisme de quarantaine (ONQ) pour l'Union Européenne et les départements d'outre-mer.

Le CTV est un virus systémique à ARN appartenant au genre *Closterovirus*, famille des *Closteroviridae*. Des études de diversités ont permis de classer les souches de CTV en plusieurs sérogroupes ou selon des profils moléculaires (ARN bicaténaires) ; mais aucune de ces classifications n'a permis d'établir clairement une relation avec la pathogénie des souches. En fonction de la triple interaction souche-variété-porte greffe, le pouvoir pathogène se manifeste par trois types de symptômes (1) le dépérissement avec le cas particulier du « quick decline » où l'arbre dépérit en quelques semaines, (2) le « stem pitting » qui se manifeste par des anomalies du cambium avec un impact négatif sur le développement de l'arbre, (3) le « seedling yellows » qui se caractérise par un rabougrissement et un jaunissement des semis de certaines espèces (orange amère, pamplemousse, citron).

La méthode décrite dans le document est directement liée à la méthode d'analyse MOA 008 « Techniques ELISA » : elle ne peut être appliquée qu'en respectant les préconisations de cette méthode.



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 nationale en vigueur.

Il est essentiel que les manipulations conduites conformément à la présente méthode soient exécutées 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.

Par ailleurs, l'utilisateur de la présente méthode doit mettre en œuvre toutes les mesures nécessaires pour garantir la non-dissémination de l'organisme nuisible dans l'environnement.

Ainsi, tout fragment de matériel végétal infecté (ou de statut indéterminé) doit être détruit par autoclavage ou autre moyen inactivant les virus.

Les consommables ayant été en contact avec le matériel végétal infecté (ou de statut indéterminé) doivent être détruits par autoclavage ou autre moyen inactivant les virus.

Le matériel ayant été en contact avec le végétal infecté (ou de statut indéterminé) doit être désinfecté.



1 Objet et domaine d'application

Objet

La méthode permet de détecter la présence du CTV sur plantes hôtes de la famille des Rutacées par la technique sérologique ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).

Domaine d'application

Du fait de sa localisation dans les vaisseaux du phloème, le virus a une répartition assez homogène dans la plante. Le virus est donc le plus concentré dans les organes riches en phloème ; écorce, pédoncule du fruit, pétiole et nervure centrale des feuilles.

La méthode s'applique sur des arbres symptomatiques ou asymptomatiques et sur la plupart des parties aériennes des plantes hôtes de la famille des Rutacées : jeunes pousses, écorce des rameaux, pétiole, limbe, pédoncule du fruit.

Compte tenu du matériel végétal disponible en verger ou à l'import (en général des rameaux « aoûtés »), les prélèvements seront le plus souvent constitués de rameaux « aoûtés » c'est à dire lignifiés à partir des dernières pousses de l'année ; les prises d'essais constituées de fragments d'écorce sont prélevées sur ces rameaux.

Le nombre d'organes végétaux à prélever dépend de l'âge et de la taille des arbres :

- pour des arbres de pépinière : 2 rameaux d'environ 10 cm ou 5 feuilles complètement développées avec pétiole attaché
- pour des arbres adultes en verger : 4 rameaux d'environ 10 cm répartis sur la canopée (un par point cardinal : nord-sud-est-ouest), ou 10 feuilles complètement développées avec pétiole attaché ou 5 fruits avec le pédoncule

Pour certaines espèces, il conviendra de s'assurer que les prélèvements effectués sont suffisants pour la prise d'essai.

Il est préférable d'éviter de faire des prélèvements aux saisons les plus chaudes de l'année et de privilégier les saisons de pousses végétatives intenses (le printemps en zone méditerranéenne).

La méthode s'applique sur du matériel végétal frais ou déshydraté.



2 Documents de référence

	Référence	Titre
1	MOA 008	Méthode officielle d'analyse « Technique ELISA Bactériologie/Virologie »
2	Rapport de validation RF-PJ/CTV01-V1-FR Juin 2015	Rapport de caractérisation et de validation de la méthode de détection du <i>Citrus tristeza virus</i> sur plantes hôtes de la famille des Rutacées par ELISA

Tableau 2 : Liste des documents de référence (hors bibliographie).

3 Termes, sigles et définitions

Les termes employés dans la méthode sont issus des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP...).

Les sigles sont explicités au fur et à mesure du texte.

4 Principe de la méthode

La technique ELISA utilise le principe d'une réaction immunologique, suivie d'une réaction enzymatique de dégradation d'un substrat. L'absorbance du milieu réactionnel, mesurée par spectrophotométrie, est d'autant plus élevée que la concentration en hydrolysate du substrat est importante.

Bien que produisant une valeur d'absorbance, il s'agit d'une méthode qualitative, c'est à dire dont la réponse est soit la présence, soit l'absence de l'organisme cible détecté dans une quantité d'échantillon donnée. 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.

Les échantillons pour lesquels des résultats indéterminés sont obtenus sont des échantillons pour lesquels la technique ne permet pas de statuer sur la présence ou non du virus.

La méthode s'intègre au schéma de détection suivant :

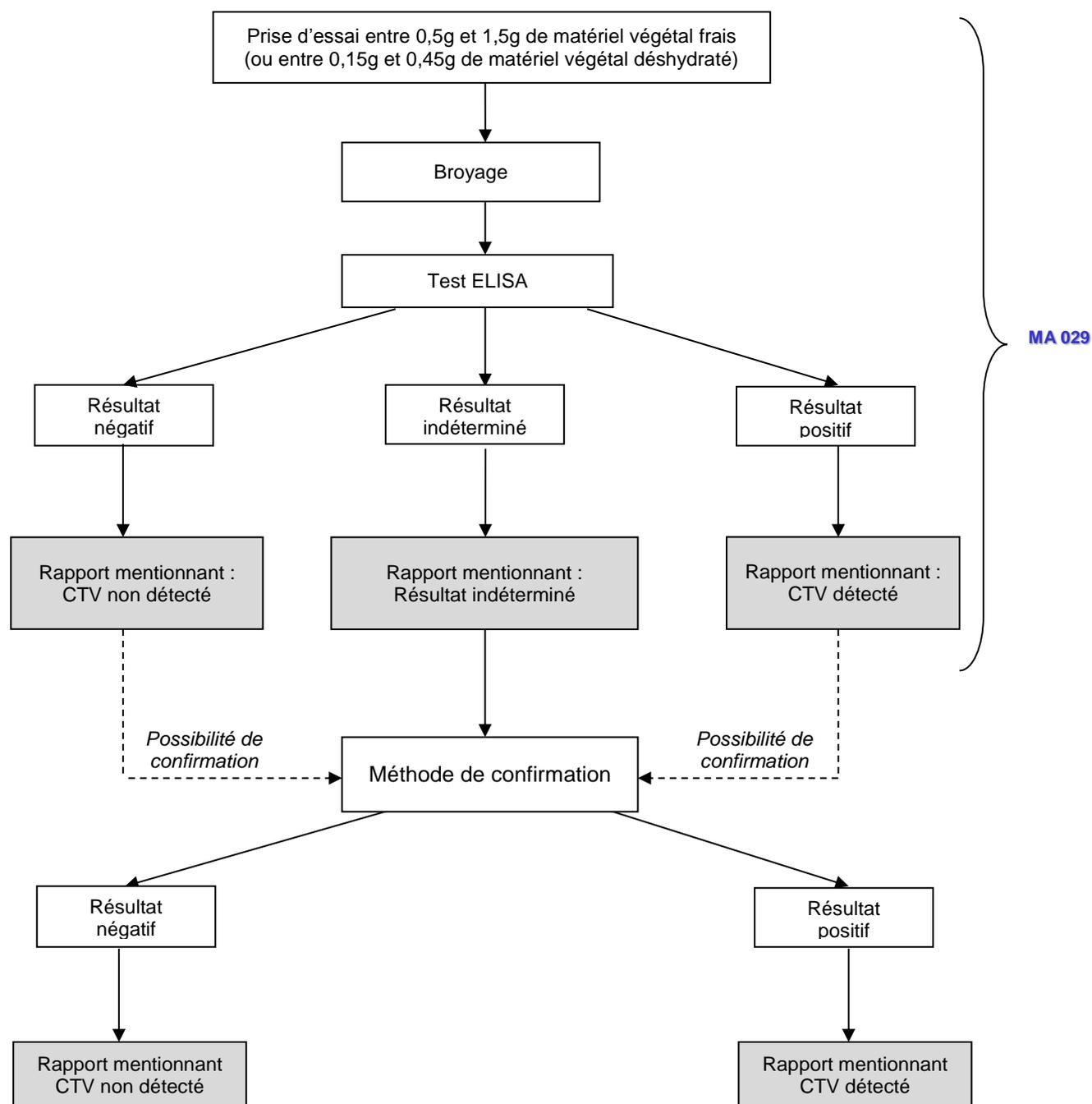


Figure 1 : Schéma de détection du CTV sur plantes hôtes de la famille des Rutacées.

Tout résultat indéterminé doit être confirmé. Par ailleurs, pour diverses raisons liées principalement à la spécificité de situations phytosanitaires régionales, le demandeur d'analyse peut également être amené à demander la confirmation d'un résultat positif ou d'un résultat négatif.

L'analyse de confirmation est réalisée de préférence à partir du reliquat de prise d'essai, à défaut à partir du broyat végétal.



5 Réactifs

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie 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, l'utilisateur doit veiller (par l'utilisation de produits et consommables certifiés, nettoyage, stérilisation ou tout autre traitement approprié) à l'absence dans l'eau, produits et consommables utilisés, de contaminations ou de tout autre élément pouvant interférer sur le résultat.

Les recommandations des fournisseurs, concernant les conditions de stockage avant utilisation, seront suivies, ainsi que la conservation en cours d'utilisation. A défaut le laboratoire définira les conditions qu'il jugera 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 des réactifs sérologiques spécifiques du CTV. La présente méthode a été caractérisée et validée de façon sensiblement équivalente avec les réactifs sérologiques NEOGEN, PLANT PRINT et SEDIAG. Les références aux numéros de lots utilisés sont données avec le tableau de synthèse des caractéristiques de performance de la méthode (tableau 5).

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

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 de préférence 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. Par contre, les tampons d'extraction et de conjugué doivent être ceux recommandés par le fournisseur de réactifs sérologiques.



Conservation

Pour les tampons commerciaux concentrés ou non : se référer aux recommandations du fournisseur.

Pour les tampons préparés au laboratoire :

- les solutions 1X : 1 mois à +5°C, sauf indication contraire ;
- les solutions 1X avec azide de sodium (dilution d'un tampon commercial concentré) : 3 mois à +5°C ;
- les solutions stock concentrées : au maximum 6 mois à température ambiante.

Certains tampons (tampons de blocage, certains tampons de broyage) doivent être préparés extemporanément, dans ce cas, il est conseillé de ne pas utiliser le tampon au-delà d'une journée.

5.4 Autres réactifs et consommables

-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 (pNPP).

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

5.5 Contrôles et témoins

Il est obligatoire d'intégrer des références de lecture sur chaque plaque de microtitration. Conformément aux exigences de la MOA 008, ces références sont constituées :

-des témoins sains (TS) : il s'agit de matrices d'agrumes de préférence identiques à celles des échantillons analysés et de préférence du même genre et/ou de la même espèce. Les témoins sains sont traités en parallèle et selon les mêmes conditions que les échantillons à analyser. Ils sont au minimum trois, déposés dans six puits, à raison de deux puits par témoin.

Ces témoins sains serviront à déterminer le seuil de positivité.

-des témoins malades (TM) : ils donnent au minimum l'assurance d'un déroulement correct de la manipulation. Pour chaque série d'analyses, on peut soit utiliser des échantillons végétaux contaminés par le CTV préparés au laboratoire (échantillons de référence naturellement contaminés) ou des témoins commerciaux positifs (lyophilisés, glycérolés...) à préparer selon les recommandations du fournisseur.

En complément d'un témoin malade (TM) à concentration virale élevée, il est conseillé, dans la mesure du possible, d'utiliser un témoin malade calibré (TMc) présentant des valeurs d'absorbances "calibrées" et situées en dessous des valeurs de saturation lors de la lecture de référence, c'est-à-dire dans la zone de proportionnalité substance colorante / valeur d'absorbance (par exemple présentant une absorbance comprise entre 0,2 et 1,2). Ce témoin permettra, au sein du laboratoire, de vérifier la reproductibilité entre microplaques et de détecter de petites anomalies de déroulement du test, susceptibles d'entraîner la non-détection d'échantillons faiblement



infectés. Il peut s'agir de témoins positifs commerciaux utilisés à une dilution appropriée, lorsqu'ils existent et sont disponibles, ou de témoins dont le statut a été établi en interne.

-des témoins tampons (TP) : Il s'agit d'un essai blanc constitué uniquement du tampon de broyage pour le contrôle du bruit de fond sur le tampon de broyage.

-et des témoins substrat (appelés également puits substrat) : Une colonne des plaques de microtitration est remplie d'eau de qualité analytique à chaque étape de dépôt, excepté à la dernière étape où elle est remplie de la solution de substrat. Cette colonne permet de faire le "blanc" ou zéro optique sur le spectrophotomètre du lecteur de plaques de microtitration. Si l'appareil de lecture ne permet pas de produire automatiquement des valeurs d'absorbances corrigées, la moyenne des absorbances des puits substrat est soustraite de l'absorbance brute des essais.

L'utilisation de ces références sert à valider le bon déroulement des différentes étapes de l'analyse ainsi que les résultats obtenus sur les différentes microplaques.

6 Appareillage et matériels

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie 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.

6.1 Broyeur

Différents systèmes de broyage peuvent être utilisés, en fonction de l'appareillage disponible au laboratoire. Toutes les méthodes sont valables à condition de mettre en œuvre les moyens qui permettent d'éviter les risques de contaminations croisées. L'utilisation d'un broyeur à bille (type Homex 6 de Bioreba), avec broyage de l'échantillon dans un sachet en plastique spécialement prévu à cet effet, muni d'une gaze de filtration à mailles résistante (en nylon) est recommandée. Le broyat peut alors être récupéré directement dans le sachet. Une autre méthode de broyage par un broyeur à couteau (type Polytron) donne des résultats équivalents mais nécessite la filtration du broyat et la décontamination du couteau entre 2 échantillons.

6.2 Spectrophotomètre

La méthode a été caractérisée et validée sur un spectrophotomètre de type TECAN Sunrise™. 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.



6.3 Mesures

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 < à 10mL : EMT = $\pm 10\%$ volume \geq à 10mL : EMT = $\pm 5\%$
Masse	EMT = 10%
pH	EMT = 0,3 unité pH
Température	incubateur : EMT = $\pm 3^{\circ}\text{C}$ réfrigérateur : 5°C et EMT = $\pm 4^{\circ}\text{C}$ congélateur : $\leq -18^{\circ}\text{C}$ congélateur froid intense : $\leq -65^{\circ}\text{C}$
Longueur	EMT = 10%
Temps	EMT = 10%

Tableau 3 : EMT par grandeur.

7 Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Cas d'échantillons frais : chaque prise d'essai est constituée au minimum de 0,5g de matériel végétal frais et au maximum de 1,5g de matériel végétal frais, ce qui nécessite au moins deux rameaux d'environ 10 cm de longueur ou 5 feuilles avec pétiole ou 5 fruits avec pédoncule. Le matériel végétal doit arriver au laboratoire dans un état de fraîcheur approprié (rameaux, feuilles et fruits frais sans signe de sénescence ou de dessèchement).

Cas d'échantillons déshydratés (échantillons lyophilisés ou déshydratés selon la technique de BOS (Bos, 1983)), la prise d'essai est constituée au minimum de 0,15g de matériel végétal déshydraté et au maximum de 0,45g de matériel végétal déshydraté. Les échantillons doivent être complètement déshydratés (sans développement de moisissures et conditionnés dans un conditionnement étanche à la vapeur d'eau).

Si la quantité de matériel végétal reçue au laboratoire est insuffisante, des réserves sont émises quant au résultat d'analyse si ce dernier est négatif.

Si les échantillons arrivent au laboratoire dans un état dégradé, le laboratoire émet des réserves sur tout résultat d'analyse négatif en précisant l'état dégradé de l'échantillon à la réception au laboratoire. Si les échantillons arrivent dans un état très dégradé, le laboratoire peut refuser l'analyse. Le refus d'analyse doit être motivé et doit être notifié au client dans les plus brefs délais.



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 le matériel prélevé dans de bonnes conditions, le délai entre la réception des échantillons frais et le début effectif de l'analyse doit être de préférence inférieur à 7 jours et ne doit pas dépasser 10 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.

D'autres modes de conservation peuvent être envisagés : la lyophilisation, la dessiccation par la méthode de BOS (dessiccation en présence de chlorure de calcium). Ces modes de conservation peuvent avoir une incidence sur la charge virale des échantillons et donc parfois induire des résultats faussement négatifs (échantillons faiblement contaminés détectés négatifs). Lorsque le laboratoire est contraint d'utiliser du matériel lyophilisé ou en BOS, le rapport d'analyse doit mentionner cette particularité : « Echantillon traité après conservation (citer le mode de conservation) ».

7.3 Conservation des échantillons après analyse

Les laboratoires doivent conserver les reliquats pertinents (nature, quantité et qualité) de matériel soumis à analyse, dans des conditions appropriées garantissant leur intégrité (cf. tableau ci-après), jusqu'à au moins le quinzième jour calendaire suivant l'envoi au demandeur du rapport d'analyse. Dans le cas d'un résultat positif ou indéterminé, ce délai est prolongé à 12 mois pour les reliquats qui le permettent selon les modalités détaillées dans le tableau ci-après.

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 ou une analyse de confirmation.

Etape	Type de reliquat	Conservation		Modalités d'envoi à un autre laboratoire le cas échéant
		Conditions	Durée	
Prise d'essai	Matériel végétal frais	+5°C	Tout résultat : 15 jours après envoi du rapport	Sachets individuels fermés et clairement identifiés Température ambiante Transporteur express avec suivi
	Matériel végétal déshydraté	Dans un environnement sec (exemple: en boîte hermétique) à température ambiante, ou en conditions réfrigérées	Résultat négatif : 15 jours après envoi du rapport Résultat positif ou indéterminé : 12 mois après envoi du rapport	Tubes/ pots hermétiques clairement identifiés Température ambiante Transporteur express avec suivi



Etape	Type de reliquat	Conservation		Modalités d'envoi à un autre laboratoire le cas échéant
		Conditions	Durée	
Broyage	Broyat végétal	≤-18°C	Résultat négatif : 15 jours après envoi du rapport	Tubes hermétiques clairement identifiés Température ambiante Transporteur express avec suivi
			Résultat positif ou indéterminé : 12 mois après envoi du rapport	

Tableau 4 : Types de reliquats d'échantillons à conserver et conditions de leur conservation pour les besoins d'analyses contradictoires et /ou de confirmation.

8 Mode opératoire

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

Pour le matériel déshydraté (échantillons lyophilisés ou en BOS), la prise d'essai est constituée au minimum de 0,15g de matériel végétal déshydraté et au maximum de 0,45g de matériel végétal déshydraté.

Pour le matériel frais, chaque prise d'essai est constituée d'un minimum de 0,5g de matériel végétal frais et d'un maximum de 1,5g de matériel végétal frais, ce qui nécessite au moins 2 rameaux (ou pousses) de 10 cm ou 5 feuilles avec pétiole ou 5 fruits avec pédoncule.

Remarque :

-Si l'échantillon est constitué de davantage d'unités (rameux, feuilles avec pétiole ou fruits avec pédoncule) que nécessaire pour la prise d'essai, le prélèvement se fait, si possible, sur une part la plus représentative possible de l'ensemble de l'échantillon reçu (a minima sur le nombre d'unités précisé précédemment).

-Si l'échantillon est constitué de plusieurs organes (rameaux, feuilles) d'un même arbre, il convient de faire la prise d'essai sur un mélange de fragments prélevés sur tous les organes.

Pour les rameaux, le prélèvement pour analyse est constitué de fragments d'écorce prélevés avec un scalpel.

Pour les feuilles, le prélèvement pour analyse est constitué de préférence des parties riches en phloème (c'est à dire nervure centrale et pétiole) ; en cas d'insuffisance de matériel végétal, le limbe peut être utilisé. L'utilisateur veillera à prélever les tissus les mieux conservés (absence de signe de sénescence).

Pour les fruits, le prélèvement pour analyse est constitué de fragments de pédoncules sur la partie adhérente au fruit.

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.

Suite à la prise d'essai, les reliquats de matériel végétal sont conservés selon les modalités indiquées dans le tableau 4.



8.2 Broyage de l'échantillon

Broyer le matériel végétal dans le tampon de broyage préconisé par le fournisseur de réactifs sérologiques et selon le ratio masse/volume préconisé par le fournisseur (généralement 1/10, soit par exemple 0,5g de matériel végétal frais pour 4,5mL de tampon), à l'aide d'un broyeur à billes, ou de toute autre méthode de broyage permettant d'obtenir des résultats équivalents.

Pour une prise d'essai sur matériel végétal déshydraté, le ratio préconisé est de 0,15g de matériel déshydraté pour 4,5mL de tampon (à adapter proportionnellement selon la masse de matériel déshydraté constituant la prise d'essai).

Les broyats obtenus doivent être conservés à +5°C et utilisés le plus vite possible (au plus tard dans la journée). Après dépôt, les broyats sont conservés selon les modalités indiquées dans le tableau 4.

8.3 Déroulement du test sérologique

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

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, les consignes suivantes peuvent être appliquées :

Coating (Immunoglobulines IgG) : au moment de l'emploi, les IgG sont diluées puis homogénéisées dans du tampon coating. Remplir les puits des microplaques à raison de 100µL / puits.

Incuber à + 37°C ou à température ambiante, durée à fixer comprise entre environ 2h et 4h ; ou encore à +5°C pendant une nuit.

Lavages : au minimum 3 lavages, chacun comportant un temps d'incubation du tampon de lavage dans les puits d'environ 2 à 4 minutes avant de vider.

Dépôt des extraits : remplir les puits à raison de 100µL (ou 200µL) / puits avec les extraits de plante.

Incuber à température ambiante pendant environ 2h ou à +5°C pendant une nuit.

Lavages : au minimum 3 lavages, chacun comportant un temps d'incubation du tampon de lavage dans les puits d'environ 2 à 4 minutes avant de vider.

Conjugué (Immunoglobulines couplées à l'enzyme IgG-E) : au moment de l'emploi, les IgG-E sont diluées puis homogénéisées dans du tampon conjugué. Remplir les puits à raison de 100µL (ou 200µL) / puits.

Incuber à + 37°C ou à température ambiante, durée à fixer comprise entre environ 2h et 4h ; ou encore à +5°C pendant une nuit.



Lavages : au minimum 3 lavages, chacun comportant un temps d'incubation du tampon de lavage dans les puits d'environ 2 à 4 minutes avant de vider.

Substrat : pour un marquage à la phosphatase alcaline (le plus fréquent), le substrat, p-nitrophényl phosphate, est mis en solution dans du tampon substrat, selon le ratio 1mg/ml. Remplir les puits des microplaques à raison de 100µL (ou 200µL) / puits. Incuber à + 37°C ou à température ambiante.

Lecture : pour le marqueur phosphatase alcaline et le p-nitrophényl phosphate comme substrat, la lecture se fait à 405 nm. Plusieurs lectures peuvent être réalisées à des temps différents.

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.

En général, la lecture de référence utilisée pour calculer les seuils est effectuée à environ 2h.

Remarque : *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 à l'obscurité à des températures contrôlées durant toutes les phases d'incubation peuvent être des mesures préventives y contribuant.*

Toutes ces étapes simples doivent être menées avec soin, constance et rigueur, notamment les opérations de lavage.

9 Résultats

9.1 Contrôle qualité

L'observation et conformité à l'attendu des résultats obtenus sur les témoins décrits au §5.4 sont un préalable à l'interprétation des résultats obtenus sur les échantillons soumis à analyse. Ainsi les résultats des échantillons soumis à analyse ne sont interprétables qu'à partir du moment où tous les critères de validation des microplaques présentés dans la MOA 008 sont vérifiés.

9.2 Calculs et expression des résultats

Calcul des seuils

En absence de recommandations explicites, de la part du fournisseur de réactifs, l'interprétation des résultats peut se pratiquer sur la base du calcul de deux seuils, notés S1 et S2 :

$$S1 = \text{« Moyenne absorbances corrigées des TS »} \times 2$$

$$S2 = \text{« Moyenne absorbances corrigées des TS »} \times 3$$

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



Remarque : le calcul n'est possible que si les valeurs des absorbances des TS ne sont pas trop faibles ($\geq 0,020$) et si le calcul du seuil S2 donne une valeur d'absorbance $\geq 0,060$. En effet, sur des valeurs d'absorbance très faibles le calcul devient aberrant car en dehors de la zone de proportionnalité substance colorante / valeur d'absorbance. Dans ce cas, un seuil de positivité donné en valeur corrigée, par exemple $S2=0,060$ (pour la lecture de référence à environ 2h) peut se substituer au seuil basé sur la moyenne des absorbances des témoins sains. On fixera en conséquence S1 aux deux tiers de la valeur de S2, soit dans l'exemple précédent $S1=0,040$.

Selon l'expérience du laboratoire par rapport à la spécificité de certaines matrices, une autre valeur d'absorbance pourra être retenue comme seuil minimal de positivité.

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

Pour chaque échantillon, on considère la moyenne d'absorbance corrigée des 2 puits. Cette moyenne est comparée aux seuils S1 et S2.

Expression des résultats

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

Positif : La moyenne des valeurs de l'absorbance de l'échantillon est supérieure ou égale à S2. Le résultat est : « *Citrus tristeza virus* détecté dans l'échantillon analysé selon la technique ELISA ».

Indéterminé : La moyenne des valeurs de l'absorbance de l'échantillon est comprise dans l'intervalle [S1 ; S2]. Le résultat est : « Résultat indéterminé concernant la détection du *Citrus tristeza virus* pour l'échantillon analysé selon la technique ELISA ».

Négatif : La moyenne des valeurs de l'absorbance de l'échantillon est inférieure à S1. Le résultat est : « *Citrus tristeza virus* non détecté dans l'échantillon analysé selon la technique ELISA ».

Reliquats d'échantillons : cf. § 7.3.



10 Caractéristiques de performance de la méthode

Synthèse des caractéristiques de performance extraite du rapport de validation établi par le LNR sous la référence RF-PJ/CTV01-V1-FR, juin 2015.

Méthode : Détection du *Citrus tritzesa virus* (CTV) sur plantes hôtes de la famille des Rutacées par la technique sérologique ELISA. Caractérisation effectuée avec les réactifs sérologiques :

- NEOGEN (anticorps coating lot N°00705 et 06206; anticorps conjugués lots N° A/B11304 et A/B06206);
- PLANT-PRINT (anticorps coating et conjugués lot avec date de péremption novembre 2012);
- et SEDIAG (anticorps coating lot N°110313; anticorps conjugués lots N° 110209 et 020312).

Référence : MA 029 Version 1

Domaine : Santé des végétaux

Laboratoire national de référence : Laboratoire de la santé des végétaux – Unité Ravageurs et pathogènes tropicaux

Caractéristique	Paramètre	Résultat obtenu lors de la caractérisation	Principales informations relatives aux modalités de réalisation de la caractérisation
Sensibilité	Pourcentage d'échantillons détectés parmi les échantillons cibles	92%	12 échantillons cibles testés en triplicat (tableau 2**) : 3 plaques (2 puis/plaque). Un échantillon-cible n'est pas détecté par les 3 <i>antisera</i> , il semble davantage s'agir d'un problème de seuil de détection (cible présente en faible quantité) que d'inclusivité.
Spécificité	Pourcentage d'échantillons non détectés parmi les échantillons non-cibles	100%	18 échantillons non-cibles testés en triplicat (tableau 3**) : 3 plaques (2 puis/plaque).
Exactitude	Pourcentage de vrais positifs et de vrais négatifs parmi des échantillons cibles et des échantillons non-cibles	96%	12 échantillons cibles testés en triplicat (tableau 2**) et 18 échantillons non-cibles testés en triplicat (tableau 3**) : 3 plaques (2 puis/plaque).



Caractéristique	Paramètre	Résultat obtenu lors de la caractérisation	Principales informations relatives aux modalités de réalisation de la caractérisation
Seuil de détection	Niveau de concentration le plus bas pour lequel tous les résultats (100%) sont positifs	$[2.10^{-3}; 2.10^{-2}].SM^*$	8 échantillons cibles (tableau 5**) dont -5 échantillons terrain à absorbance élevée en solution-mère (Abs>3), 5 niveaux de concentration (tableau 6**) : SM à $10^{-4}.SM$; chaque modalité est déposée en triplicat (3 plaques, 2 puits/plaque). -3 témoins positifs commerciaux à absorbance moyennement élevée, 6 niveaux de concentration (tableau 6**) : SM à $2.10^{-4}.SM$; chaque modalité est déposée en duplicat (2 plaques, 2 puits/plaque).
Répétabilité (interplaque)	Pourcentage d'accords entre résultats interplaques pour les mêmes échantillons	85% à 94%	8 échantillons cibles (tableau 5**) dont -5 échantillons terrain à absorbance élevée en solution-mère (Abs>3), 5 niveaux de concentration (tableau 6**) : SM à $10^{-4}.SM$; chaque modalité est déposée en triplicat (3 plaques, 2 puits/plaque). -3 témoins positifs commerciaux à absorbance moyennement élevée, 6 niveaux de concentration (tableau 6**) : SM à $2.10^{-4}.SM$; chaque modalité est déposée en duplicat (2 plaques, 2 puits/plaque).

Tableau 5 : Synthèse des caractéristiques de performance de détection du CTV sur plantes hôtes de la famille des Rutacées par la technique ELISA.

*SM=broyat dans le ratio 1/10 pour NEOGEN et SEDIAG (par exemple 0,5g de matériel végétal pour 4,5mL de tampon de broyage) ou le ratio 1/20 pour PLANT PRINT (par exemple 0,5g de matériel végétal pour 9mL de tampon de broyage).

** En référence au rapport de validation RF-PJ/CTV01-V1-FR, juin 2015.



Annexe 1 – Plan de plaque

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	substrat*	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau
B	substrat*	Ech 1 Rep 1				TS2					TMc	eau
C	substrat*	Ech 1 Rep 2				TS2					TMc	eau
D	substrat*	TS1									TP	eau
E	substrat*	TS1									TP	eau
F	substrat*	Ech 2 Rep 1								TS3	TM	eau
G	substrat*	Ech 2 Rep 2								TS3	TM	eau
H	substrat*	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau

Figure 2 : Plan de plaques

**eau sauf à la dernière étape où l'eau est remplacée par du substrat*

Observations : Le "blanc" du lecteur de microplaques est réalisé sur la première colonne qui est chargée en solution substrat à la dernière étape.

Les extraits sont doublés verticalement.

Excepté pour la colonne 1 (puits substrat), les lignes et colonnes de bordure sont remplies avec de l'eau à toutes les étapes. Le tour d'eau n'est pas obligatoire si le système de couverture de la microplaque est étanche et que le laboratoire peut prouver qu'il n'y a pas d'effet de bordure.



Bibliographie

- 1-Albertini D., 1986. Virus de la Tristeza des agrumes : étude d'une nouvelle souche n'induisant pas de symptômes sur plantes indicatrices. Thèse d'Université, Biologie et physiologie Végétales, Université Bordeaux II, Bordeaux : 99p
- 2-Aubert, B., Vogel R., Bové J.M., et Bové Ci. 1982. Affections virales des agrumes transmises par pucerons à l'île de la Réunion. Fruits, vol 37 N°7-8 : p 441-465.
- 3-Aubert B., & Bové C., 1984. Mild and severe strains of Citrus tristeza virus in Reunion Island. In: Proc. Ninth Int. Citrus Virologists, (Garnsey S.M., Timmer L.W., & Dodds J.A. Edts), riverside, Univ. of California, IOCV, pp: 57-61
- 4-Aubert B., Etienne J., Cottin R., Leclant F., Cao Van P., Vuillauma C., Jaramillo C ;, & Barbeau G., 1992. Citrus tristza disease a new threat for caribbean basin. Report of of a survey to Colombia, Dominican Republic, Guadeloupe, Martinique and Trinidad. Fruits, 3:393-404
- 5-Aubert B., Vullin G., 1997. Pépinières et plantations d'agrumes. Collection Techniques Eds CIRAD. 184P
- 6-Bar-Joseph M., & Loebenstein G., 1973. Effect of temperature on peroxidase activity, ioszyme patterns and concentration of thrad like particles in Tristeza-infected Citrus plants. Phytoparistica , 3-12
- 7-Bar-Joseph M., Garnsey S.M., Gonsalves D., Moscovitz M., Purcifull D.E., Clark M.F. & Loebenstein G., 1979. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of citrus tristeza virus. Phytopathology 69, 190-194
- 8-Bertin Y., 1999 La Tristeza des agrumes à la Martinique: situation en 1998. Tropical Fruits Newsletter (30): 10-12
- 9-Bertolini E., Moreno A., Capote N., Olmos A., de Luis A., Vidal E., Pérez-Panadès J., & Cambra M., 2008. Quantitative detection of Citrus tristez virus in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. Eur. J. Plant Pathol. 120: 177-188
- 10-Bos L. 1983. Order out of chaos : Preservation in BOS, 102-104. In Introduction to plant virology, 160p., Pudoc Wageningen, Pays-Bas.
- 11-Cambra M., Garnsey S.M., Permar T.A., Henderson C.T., Gumph D. & Vela C., 1990. Detection of citrus tristeza virus (CTV) with a mixture of monoclonal antibodies. Phytopathology 80, 103
- 12-Cambra M., Olmos A., Gorris M.T., Marroquin C., Esteban O., Garnsey S.M., Llauger r., Batista L., Pena I., & Hermoso de Mendoza A., 2000. Detection of citrus tristeza virus by print capture and squash capture-PCR in plants tissues and single aphids. Proccedings 14th International conference of the organization of citrus virologists, pp. 42-48. IOCV, Riverside (US)
- 13-Cambra M; Gorris M.T., Marroquin C., Roman M.P., Olmos A., Martinez M.C., Hermoso de Mendoza A., Lopez a., & Navarro I., 2000. Incidence ans epidemiology of Citrus tristeza virus in the Valancian community of spain. Virus Research 71: 85-95



- 14-Clark M.F., & Adams A.N., 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34: 475-483.
- 15-Dodds J.A., Jarupat T., Lee J.G. & Roistacher C.N., 1987. Effects of strain, host, time of harvest and virus concentration on double-stranded RNA analysis of citrus tristeza virus. *Phytopathology*, 77: 442-447.
- 16-Garnsey S.M., Cirverolo E.L., Gumpff D.J, Yokomi R.K. & Lee R.F. 1991. Development of a worldwide collection of citrus tristeza virus isolates. P113-120 In Proc. 11th Conf. IOCV, IOCV Riverside
- 17-Garnsey S.M., & Cambra M., 1991. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for citrus pathogens. In *Graft-Transmissible diseases of citrus . Handbook for detection and diagnosis* (Ed. Rositacher CN), pp. 1-7 IOCV, Riverside (US)
- 18-Garnsey S.M., Permar T.A, Cambra M., &Henderson C.T., 1993. Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of citrus tristeza virus (CTV) Proceedings 12th International Conference of the Organization of Citrus Virologists, pp. 39-50. IOCV, Riverside (US).
- 19-Grisoni, M., 1995. Le virus de la tristeza des agrumes (CTV) Variabilité de l'agent pathogène et épidémiologie de la maladie dans les conditions de l'île de la Réunion. Thèse d'Université, biologie des systèmes intégrés, Montpellier, 166p
- 20-Guerri J., Moreno P., & Lee R.F., 1990. Identification of citrus tristeza virus strains by peptide maps of virion coat protein. *Phytopathology* 80, 692_698
- 21-Kitajima E.W., Silav D.M., Oliveira A.R., Muller G.W. & Costa A.S., 1964. Thread like particles associated with tristeza disease of citrus, *Nature* 201: 1011-1012
- 22-Moreno P., Guerri J., Ballester-Olmos J.F. & Albiach R., 1993. Separation and interference of strains from Citrus tristeza virus isolate evidenced by biological activity and double stranded RNA (ds RNA) analysis. *Plant Pathology*, 42: 35-41
- 23-Moreno P., Ambros S., Albiach-Marti M.R., Guerri J., and Pena L., 2008. Citrus triteza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular plant pathology* 9(2), 251-268
- 24-OEPP/EPPO, 2004. Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés: Citrus tristeza closterovirus PM7/31 (1). *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 34, 239-246
- 25-OEPP/EPPO, 1997. Data sheets on quarantine pests, Citrus tristeza closterovirus. In *Quarantine pests for Europe, Data sheets on quarantine pests for the European union and for the European and Mediterranean plant protection organization*, CABi eds, pp 1255-258
- 26-Permar T.A, Garnsey S.M, Gumpf D.J. & Lee R., 1990. A monoclonal antibody that discriminates strains of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 80, 224-228
- 27-Roistacher C.N., Dodds J.A., & bash J.A., 1988. Cross protection against citrus tristeza seedling yellows and stem pitting virus by protective isolates developed in greenhouse plants. Proc. In: *Org. Citrus Virologists* (Timmer L.W., Garnsey S.M., & Navaroo L. Edts), Riverside, Univ. of California, IOCV, pp91-100
- 28-Roistacher C.N., &Moreno P., 1991. The worldwide threat from destructive isolates of citrus tristeza virus. – A review. In Proc. Eleventh Conf. Int Org. Citrus Virologists, (Brlansky R.H., lee R.F., & Timmer L.W. Edts), Riverside, Univ. of California, IOCV, pp: 7-19



29-Vogel R., Bové J.M., 1982. Influence de maladies transmissibles sur le développement et la production de clémentineir en Corse. *Fruits* 37 (4) : 229-236

30-Yokomi R.K., & Garnsey S.M., 1987. Transmission of citrus tristeza virus by *Aphis gossypii* and *Aphis citricola* in Florida. *Phytophylactica*, 19: 169-172