



Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV MA 037 - Version 1

Jun 2015

Détection du
Cymbidium mosaic virus (CymMV)
sur *Orchidaceae*
par la technique sérologique ELISA



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 sur le projet de méthode a été organisée du 8 janvier 2015 au 27 février 2015 sur le site internet de l'Anses, et notamment auprès des laboratoires agréés français.



Avant-propos

La présente 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 des virus sur plantes tropicales.

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/CY01-V1-FR, mai 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 Bactériologie, Virologie et OGM).



Sommaire

Avant-propos.....	3
Introduction	5
Avertissements et précautions de sécurité	6
1 Objet et domaine d'application	7
2 Documents de référence	7
3 Termes, sigles et définitions	7
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.....	13
7.3 Conservation des échantillons après analyse.....	14
8 Mode opératoire	14
8.1 Préparation des échantillons pour analyse	14
8.2 Broyage de l'échantillon	15
8.3 Déroulement du test sérologique	15
9 Résultats.....	16
9.1 Contrôle qualité	16
9.2 Calculs et expression des résultats	16
10 Caractéristiques de performance de la méthode	17
Annexe 1 – Plan de plaque	19
Bibliographie	20



Introduction

La méthode décrite dans ce document permet de détecter spécifiquement le *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) qui est l'agent responsable de la mosaïque du Cymbidium et qui infecte de nombreuses orchidées dont celles du genre *Vanilla* (vanilliers).

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

Le CymMV est un virus systémique à ARN (8) appartenant au genre *Potexvirus*, famille *Alfalexiviridae*. L'étude de différents isolats de CymMV notamment sur le gène codant pour la protéine de capsid (CP) a montré l'existence de 2 sous-groupes, A et B (3,10,15). Les isolats des deux groupes sont indiscernables au niveau des protéines déduites des séquences nucléotidiques. Le CymMV est très fréquent sur les orchidées ornementales cultivées. C'est aussi le virus le plus fréquemment rencontrés sur vanilliers.

Sur orchidées ornementales, les symptômes de CymMV se présentent sous la forme de taches chlorotiques ou nécrotiques ainsi que sous la forme de stries sur feuilles et fleurs, et les plants ont une croissance réduite.

Sur vanille, l'infection par CymMV est souvent asymptomatique mais peut présenter des symptômes foliaires tels que des stries chlorotiques sur *Vanilla planifolia* et *V. xtahitensis*, ainsi que des taches nécrotiques sur tige et feuilles sur *V. planifolia*¹.

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.

¹Des références bibliographiques complémentaires concernant le CymMV sont disponibles dans la partie « bibliographie » (principales références : 1-7, 9, 11-14, 16-19).



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

Domaine d'application

La méthode s'applique sur feuilles d'orchidées fraîches, symptomatiques ou asymptomatiques. En l'absence de feuilles (variété aphyllé par exemple), la méthode peut s'appliquer sur tiges voire sur racines. En effet, du fait de son caractère systémique, le virus a une répartition homogène dans la plante. La prise d'essai est constituée au minimum de 0,5g de matériel végétal frais et au maximum de 1,5g de matériel végétal frais.

2 Documents de référence

	Référence	Titre
1	MOA 008	Méthode officielle d'analyse « Technique ELISA Bactériologie/Virologie »
2	Rapport de validation RF-PJ/CY01-V1-FR Mai 2015	Rapport de caractérisation et de validation de la méthode de détection du <i>Cymbidium mosaic virus</i> sur <i>Orchidaceae</i> 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 hydrolysats 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 :

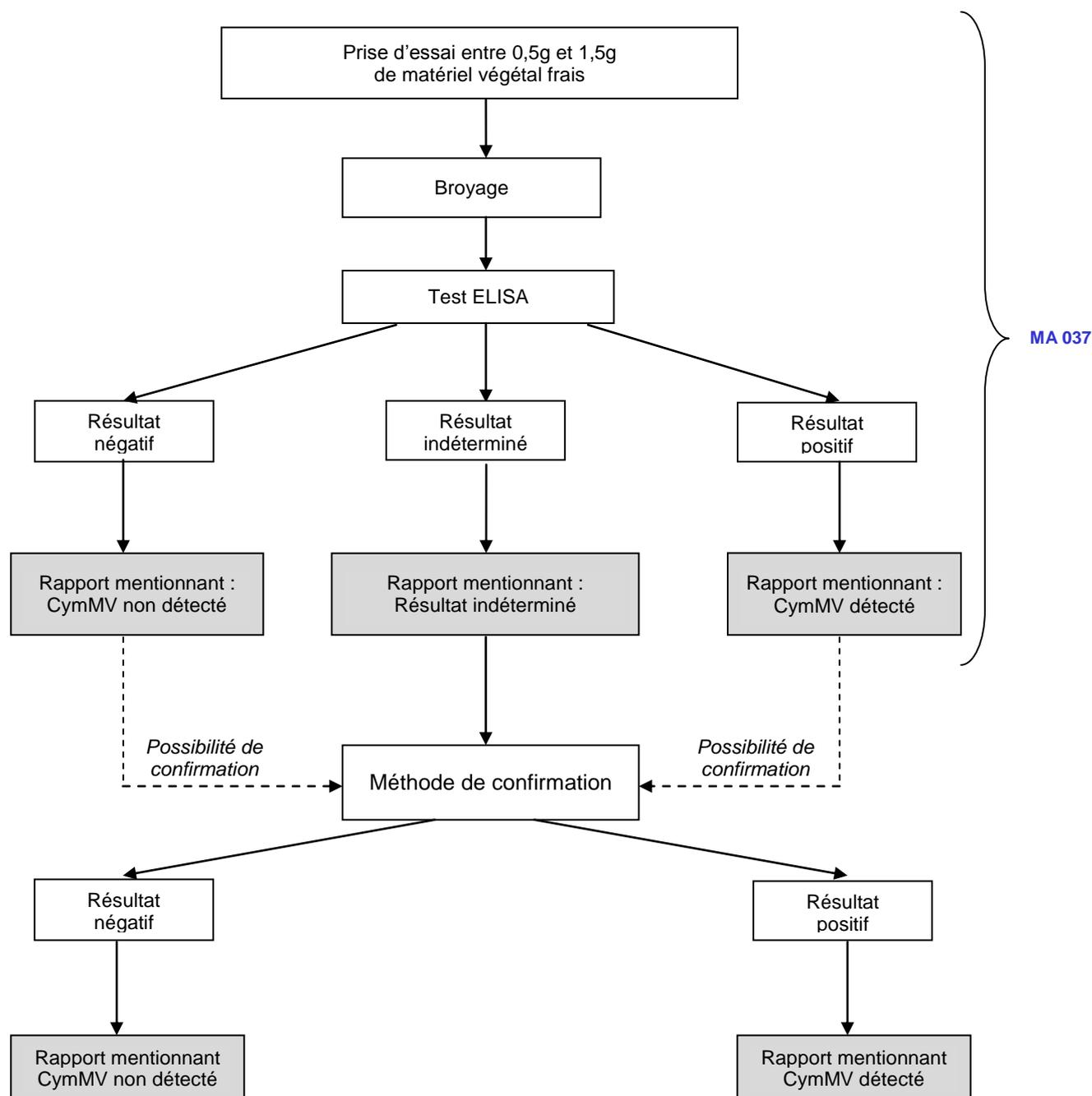


Figure 1 : Schéma de détection du CymMV sur *Orchidaceae*.

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 CymMV. La présente méthode a été caractérisée et validée de façon sensiblement équivalente avec les réactifs sérologiques AGDIA, PRI 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 référence d'*Orchidaceae* non infectées par le CymMV de préférence de même nature que les échantillons à analyser : même organe, et si possible même genre quand les échantillons à analyser sont du genre *Vanilla*. 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 CymMV 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. Nous recommandons 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). 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 : $\leq -65^{\circ}\text{C}$
Temps	EMT = 10%

Tableau 3 : EMT par grandeur.

7 Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

L'échantillon pour analyse doit être constitué d'un minimum de 0,5g de matériel végétal frais (feuilles voire tiges ou racines) et d'un maximum de 1,5g. En dessous de 0,5g de matériel végétal, des réserves sont émises quant au résultat d'analyse si ce dernier est négatif.

Le matériel végétal doit arriver au laboratoire dans un état de fraîcheur approprié (feuilles turgescents sans signe de dessèchement). Dans les cas contraires, le laboratoire émet des réserves sur tout résultat d'analyse négatif en précisant l'état dégradé de l'échantillon à la réception au laboratoire. Si les échantillons arrivent dans un état très dégradé, le laboratoire peut refuser l'analyse. Le refus d'analyse doit être motivé et doit être notifié au client dans les plus brefs délais.

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 $+5^{\circ}\text{C}$.

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 reliquats	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
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

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.

Si l'échantillon est constitué de plusieurs feuilles, ou si l'échantillon est constitué d'un plant entier, la prise d'essai peut être réalisée en groupant plusieurs feuilles (maximum 5 feuilles) de façon à obtenir au moins 0,5g (et pas plus de 1,5g).

L'utilisateur veillera à prélever les tissus les mieux conservés (absence de signe de sénescence).

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.

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 (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.

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.

Remarques : *Pour éviter au cours du temps des variations non contrôlées des conditions environnementales pouvant avoir une incidence sur le déroulement des différentes réactions, il est prudent de réaliser ces opérations dans un environnement (température, hygrométrie, luminosité,...) défini et constant. L'utilisation de couvercles sur les microplaques et leur maintien 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 l'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 et si le calcul du seuil S2 donne une valeur d'absorbance $\geq 0,050$. En effet, sur des valeurs d'absorbance très faibles le calcul devient aberrant car en dehors de la zone de proportionnalité substance colorante / valeur d'absorbance. Dans ce cas, un seuil de positivité donné en valeur corrigée, par exemple $S2=0,050$ (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 $S1=0,033$.

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 : « *Cymbidium mosaic 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 *Cymbidium mosaic 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 : « *Cymbidium mosaic virus* non détecté dans l'échantillon analysé selon la technique ELISA ».

Reliquats d'échantillons : Voir paragraphe 7.3. ci-dessus

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/CY01-V1-FR, mai 2015.

Méthode : Détection du *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) sur *Orchidaceae* par la technique sérologique ELISA. Caractérisation effectuée avec les réactifs sérologiques :

- AGDIA (anticorps coating lot N°00017; anticorps conjugués lots N° A/B00017);
- PRI (anticorps coating lot N°C191216-CO; anticorps conjugués lot N° C1911102-AP);
- et SEDIAG (anticorps coating lot N°91216; anticorps conjugués lot N° 11102).

Référence : MA 037 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	100%	12 échantillons cibles testés en triplicat (tableau 4**) : 3 plaques (2 puis/plaque).
Spécificité	Pourcentage d'échantillons non détectés parmi les échantillons non-cibles	94% à 100%	12 échantillons non-cibles testés en triplicat (tableau 5**) : 3 plaques (2 puis/plaque). Des résultats indéterminés sont obtenus sur une des non-cibles avec les réactifs SEDIAG, ce qui est considéré comme acceptable car confirmation systématique des indéterminés.
Exactitude	Pourcentage de vrais positifs et de vrais négatifs parmi des échantillons cibles et des échantillons non-cibles	97% à 100%	12 échantillons cibles testés en triplicat (tableau 4**) et 12 échantillons non-cibles testés en triplicat (tableau 5**) : 3 plaques (2 puis/plaque).
Seuil de détection	Niveau de concentration le plus bas pour lequel tous les résultats (100%) sont positifs	$[10^{-3}; 10^{-2}].SM^*$	6 échantillons cibles (tableau 7**) à absorbance élevée en solution-mère (Abs>3), 6 niveaux de concentration (tableau 8**, en triplicat (3 plaques, 2 puits/plaque).
Répétabilité (interplaque)	Pourcentage d'accords entre résultats interplaques pour les mêmes échantillons	94% à 98%	6 échantillons cibles (tableau 7**), 6 niveaux de concentration (tableau 8**), en triplicat (3 plaques, 2 puits/plaque).
Reproductibilité	Pourcentage d'accords entre résultats obtenus par deux laboratoires différents pour les mêmes échantillons	96%	Test bilatéral dans deux laboratoires différents portant sur 26 échantillons d'orchidacées (orchidées ornementales et orchidées du genre <i>Vanilla</i>), dont une gamme de dilution (6 points), 3 échantillons non-cibles et 17 échantillons cibles (tableau 18**). Test réalisé uniquement avec les réactifs sérologiques PRI.

Tableau 5 : Synthèse des caractéristiques de performance de détection du CymMV sur *Orchidaceae* par la technique ELISA.

*SM=broyat dans le ratio 1/10 (par exemple 0,5g de matériel végétal pour 4,5mL de tampon de broyage).

** En référence au rapport de validation RF-PJ/CY01-V1-FR, mai 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 Rep1				TS2					TMc	eau
C	substrat*	Ech 1 Rep 2				TS2					TMc	eau
D	substrat*	TS1									TP	eau
E	substrat*	TS1									TP	eau
F	substrat*	Ech 2 Rep 1								TS3	TM	eau
G	substrat*	Ech 2 Rep 2								TS3	TM	eau
H	substrat*	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau

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. **Ajjikuttira, P. A., C. L. Lim-Ho, M. H. Woon, K. H. Ryu, C. A. Chang, C. S. Loh, and S. M. Wong.** 2002. Genetic variability in the coat protein genes of two orchid viruses: Cymbidium mosaic virus and Odontoglossum ringspot virus. *Arch Virol* **147**:1943-1954.
2. **Alvin, J. C. E., and S. M. Wong.** 1999. Detection of Cymbidium Mosaic Potexvirus and Odontoglossum Ringspot Tobamovirus Using Immuno-Capillary Zone Electrophoresis. *Phytopathology* **89**:522-528.
3. **Duval, M. F., S. Bory, S. Andrzejewski, M. Grisoni, P. Besse, S. Causse, C. Charon, M. Dron, E. Odoux, and M. Wong.** 2006. Diversité génétique des vanilliers dans leurs zones de dispersion secondaire. *Les Actes du BRG* **6**:181-196.
4. **Grisoni, M., F. Davidson, C. Hyrondelle, K. Farreyrol, M. L. Caruana, and M. Pearson.** 2004. Nature, Incidence, and Symptomatology of Viruses Infecting Vanilla tahitensis in French Polynesia. *Plant Dis.* **88**:119-124.
5. **Grisoni, M., M. Moles, P. Besse, S. Bory, M. F. Duval, and R. Kahane.** 2007. Towards an international plant collection to maintain and characterize the endangered genetic resources of vanilla. *Acta Horticulturae* **760**:83-91.
6. **Hsu, H. T., D. Vongsasitorn, and R. H. Lawson.** 1992. An improved method for serological detection of Cymbidium Mosaic Potexvirus infection in Orchids. *Phytopathology* **82**:491-495.
7. **Hu, J. S., S. Ferreira, M. Wang, and M. Q. Xu.** 1993. Detection of Cymbidium Mosaic Virus, Odontoglossum Ringspot Virus, Tomato Spotted Wilt Virus, and Potyviruses Infecting Orchids in Hawaii. *Plant Dis.* **77**:464-468.
8. **Hu, J. S., S. Ferreira, M. Q. Xu, M. Lu, M. Iha, E. Pflum, and M. Wang.** 1994. Transmission, Movement, and Inactivation of Cymbidium Mosaic and Odontoglossum Ringspot Viruses. *Plant Dis.* **78**:663-666.
9. **Khentry, Y., A. Paradornuwat, S. Tantiwiwat, S. Phransiri, and N. Thaveechai.** 2006. Incidence of Cymbidium mosaic virus and Odontoglossum ringspot virus in Dendrobium spp. in Thailand. *Crop Prot.* **25**:926-932.
10. **Moles, M., H. Delatte, K. Farreyrol, and M. Grisoni.** 2007. Evidence that Cymbidium mosaic virus (CymMV) isolates divide into two subgroups based on nucleotide diversity of coat protein and replicase genes. *Arch Virol* **152**:705-715.
11. **Odoux, E., and M. Grisoni.** 2010. Vanilla, p. 420. *In* R. Hardman (ed.), *Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles*, vol. 47. CRC Press.
12. **Palama, T. L., M. Grisoni, I. Fock-Bastide, K. Jade, L. Bartet, Y. H. Choi, R. Verpoorte, and H. Kodja.** 2012. Metabolome of Vanilla planifolia (Orchidaceae) and related species under Cymbidium mosaic virus (CymMV) infection. *Plant Physiol Biochem* **60**:25-34.



13. **Read, A., B. Bushe, and M. Shintaku.** 2007. Characterization of a Cymbidium mosaic virus isolate that is undetectable by a commercial ELISA virus detection kit. *Phytopathology* **97**.
14. **Van der Vlugt, R., and M. Berendsen.** 2002. Development of a general potexvirus detection method. *Eur. J. Plant Pathol.* **108**:367-371.
15. **Vaughan, S., M. Grisoni, M. Kumagai, and A. Kuehnle.** 2008. Characterization of Hawaiian isolates of Cymbidium mosaic virus (CymMV) co-infecting Dendrobium orchid. *Archives of Virology* **153**:1185-1189.
16. **Vejaratpimol, R., C. Channuntapipat, P. Liewsaree, T. Pewnim, K. Ito, M. Iizuka, and N. Minamiura.** 1998. Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for the Detection of Cymbidium Mosaic Virus in Orchids. *J Ferm Bioeng* **86**:65-71.
17. **Vejaratpimol, R., C. Channuntapipat, T. Pewnim, K. Ito, M. Iizuka, and N. Minamiura.** 1999. Detection and serological relationships of cymbidium mosaic potexvirus isolates. *J Biosci Bioeng* **87**:161-168.
18. **Wong, S. M., P. H. Mahtani, K. C. Lee, H. H. Yu, Y. Tan, K. K. Neo, Y. Chan, M. Wu, and C. G. Chng.** 1997. Cymbidium mosaic potexvirus RNA: complete nucleotide sequence and phylogenetic analysis. *Arch Virol* **142**:383-391.
19. **Zettler, F. W., N. J. Ko, G. C. Wisler, M. S. Elliott, and S. M. Wong.** 1990. Viruses of orchids and their control. *Plant Dis.* **74**:621-626.