



HAL
open science

Protocole d'évaluation des réactifs : essai sur deux modèles viraux et un modèle bactérien avec des techniques sérologiques

Christelle François, Vincent Herau, Delphine Robert, Jennifer Bureau, Coralie Mouniau, Isabelle Renaudin, Valérie Molinéro-Demilly, Hélène Soubllet

► To cite this version:

Christelle François, Vincent Herau, Delphine Robert, Jennifer Bureau, Coralie Mouniau, et al.. Protocole d'évaluation des réactifs : essai sur deux modèles viraux et un modèle bactérien avec des techniques sérologiques. 9ème conférence internationale des maladies des plantes, Dec 2009, Tours, France. hal-04611086

HAL Id: hal-04611086

<https://hal.inrae.fr/hal-04611086>

Submitted on 13 Jun 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

Protocole d'évaluation des réactifs : essai sur deux modèles viraux et un modèle bactérien avec des techniques sérologiques

Christelle François¹, Vincent Herau¹, Delphine Robert¹, Jennifer Bureau¹, Coralie Mouniau¹, Isabelle Renaudin¹, Valérie Molinero-Demilly¹, Héliène Soubelet¹

¹ : Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station d'Angers, 7 Rue Jean Dixmères - FR-49044 Angers cedex 01

Le décret 2007-311 du 05 mars 2007 définit les modalités de contrôle de la conformité des réactifs utilisés dans le cadre des analyses de diagnostic en santé publique vétérinaire et en protection des végétaux. Outre l'accréditation/certification des fabricants, importateurs ou distributeurs de réactifs, ce décret prévoit que les réactifs les plus importants fassent l'objet d'une évaluation visant à en garantir la performance et la sécurité : attestation initiale de conformité voire contrôle systématique des lots par le laboratoire national de référence (LNR). En tant que LNR, le LNPV s'est engagé dans la démarche de définition et d'identification des réactifs susceptibles d'être évalués puis dans la rédaction d'un guide basé sur le travail déjà mené en matière d'évaluation de méthodes au sein des LNR (détermination des critères de performance).

Dans ce cadre, le LNPV a débuté ses travaux par les réactifs sérologiques et réalisé une comparaison relative des kits ELISA et *antisera* présents sur le marché pour différents modèles d'étude puis a évalué plus finement les réactifs retenus afin de permettre leur validation pour une utilisation dans le cadre d'analyses officielles. Le présent poster présente les résultats obtenus pour le BNYVV et *Erwinia amylovora* par la technique ELISA.

Méthodes

Le choix des modèles d'étude s'est basé sur la disponibilité de plusieurs réactifs (kits / antisera) commerciaux, sur le statut des analyses de dépistage (majoritairement déléguées) et enfin sur la disponibilité d'échantillons positifs naturellement contaminés pour chacun des modèles. Des travaux ont été conduits au sein du LNPV en virologie sur le Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV) et le Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) par la technique ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) et en bactériologie *Erwinia amylovora* par les techniques d'IF (Immunofluorescence) et ELISA.

Phase de sélection (1er semestre 2009)

Pour chaque modèle et technique retenus, tous les réactifs (kits et *antisera*) disponibles sur le marché sont testés sur les mêmes souches ou isolats (5 souches ou isolats différents, 2 réplicats et 5 niveaux de concentration différents) dans les mêmes conditions (solutions-mères / échantillons aliquotés). Les concentrations testées sont celles encadrant le seuil de détection :

- estimé de la technique en bactériologie (10^5 ufc / ml) à savoir 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 et 10^3 ufc / ml ;
- déterminé pour chaque échantillon en virologie au cours de manipulations préliminaires (les échantillons ont été testés à des concentrations de l'échantillon pur au 1/50 000^e) ;

Cette pré-évaluation est effectuée sur la base de la détectabilité (inclusivité) et du seuil de détection relatif, les manipulations étant effectuées 2 fois. Cette phase permet d'exclure les réactifs les moins performants.

Phase d'évaluation et de validation (2ème semestre 2009)

Les critères de performance de sensibilité, spécificité, répétabilité et reproductibilité sont déterminés pour chacun des réactifs conservés lors de la première phase. Pour ce faire, 16 à 20 échantillons positifs et 10 échantillons ne contenant pas la cible (2 réplicats de chaque) ont été testés, les manipulations étant également effectuées 2 fois par deux opérateurs et à des moments différents.



BNYVV, symptômes sur tomate, photo LNPV



Erwinia amylovora sur pommier, photo LNPV



Test ELISA, photo LNPV

Résultats pour la technique ELISA

	Critères de performances	Kit A	Kit B	Kit B	Kit C	Kit C	Kit D	Kit D	Kit D
		1h	1h	2h	1h	2h	30mn	45mn	1h
Phase 1	Inclusivité sur 10 souches	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	6/10	6/10	6/10
	S. de détection (5 gammes) (ufc/mL)	4.5x10 ⁶ à 1.6x10 ⁷	4.5x10 ⁵ à 1.6x10 ⁶	4.5x10 ⁴ à 1.6x10 ⁵	4.5x10 ³ à 1.6x10 ⁴	4.5x10 ² à 1.6x10 ³	9x10 ⁶ à 3x10 ⁷	9x10 ⁵ à 3x10 ⁶	9x10 ⁴ à 3x10 ⁵
Phase 2	Inclusivité (sur 42 échantillons)	91%	91%	91%	81%	81%	26%	41%	60%
	Spécificité*	36%	36%	36%	36%	36%	64%	55%	55%
	Répétabilité intra-plaques	88%	93%	95%	77%	81%	66%	86%	85%
	Répétabilité inter-plaques	72%	98%	98%	74%	91%	67%	54%	63%

Résultats obtenus pour la détection de *Erwinia amylovora* par la technique ELISA

	Critères de performances	Kit A 2h	Kit B 2h	Kit C 2h	Kit D 2h	Kit E 2h	Kit F 2h	Kit G 2h	Kit H 2h
		Phase 1	Inclusivité sur 10 souches	10/10	10/10	10/10	7/10 + 1 dx	10/10	10/10
Phase 2	S. de détection relatif (5 gammes)	1/1 : 3 / 1500 ^e : 1 / 500 ^e : 1	1/ 5000 ^e : 2 / 10000 ^e : 3 / 1500 ^e : 3	1/ 1 : 1 / 150 ^e : 1 / 1 : 4 / 1500 ^e : 3	ND : 1 / 1 : 2 / 1500 ^e : 2	1/ 1 : 5 / 1500 ^e : 1	1/ 1 : 4 / 1500 ^e : 1	1/ 1 : 4 / 1500 ^e : 1	1/ 1 : 4 / 1500 ^e : 1
	Inclusivité (sur 46 échantillons)	96%	96%					96%	96%
	Spécificité	100%	100%					100%	100%
	Répétabilité intra-plaques	96.2%	97.5%					98.2%	96.7%
Répétabilité inter-plaques	85.1%	91.4%					74.1%	86.4%	

Résultats obtenus pour la détection du BNYVV par la technique ELISA

* Réactions croisées observées avec *E. herbicola*, *P. pyrifoliae*, *P. stewartii*, *Ps. syringae*, *B. rubrifaciens*, *Ps. morsprunorum*, *P. agglomerans*.

Conclusions et perspectives

Les travaux conduits au LNPV ont permis de rédiger un protocole d'évaluation des kits ELISA et des *antisera* utilisés en IF utilisable soit en évaluation initiale en vue de la délivrance d'une attestation par le LNR, soit en routine pour vérifier la qualité des nouveaux lots. La première partie d'étude a déjà permis de montrer des différences entre kits (sensibilité relative et seuil de détection). La seconde partie permet de les évaluer globalement et ainsi de statuer sur leur conformité à un usage dans le cadre d'analyses officielles et même d'effectuer un classement des différents kits au regard de leurs critères de performance respectifs.

Cette première étude portant sur les réactifs sérologiques doit aboutir à l'établissement d'un guide complet proposant la méthodologie d'évaluation des autres types de réactifs critiques nécessaires aux analyses officielles.