
**Qualité de l'eau — Mesurages
biochimiques et physiologiques sur
poisson —**

**Partie 3:
Dosage de la vitellogénine**

iTeh STANDARD PREVIEW
*Water quality — Biochemical and physiological measurements on fish —
Part 3: Determination of vitellogenin*
(standards.iteh.ai)

[ISO 23893-3:2013](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/892154d3-9f09-43fa-bbfa-63099ae98903/iso-23893-3-2013)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/892154d3-9f09-43fa-bbfa-63099ae98903/iso-23893-3-2013>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 23893-3:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/892154d3-9f09-43fa-bbfa-63099ae98903/iso-23893-3-2013>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2013

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
Introduction	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	2
5 Critères minimaux de performance	2
6 Environnement d'essai	3
7 Réactifs	3
8 Appareillage	4
9 Mode opératoire d'échantillonnage	4
9.1 Échantillonnage des poissons.....	4
9.2 Échantillonnage du plasma sanguin.....	5
9.3 Conservation des échantillons de plasma sanguin.....	5
10 Mode opératoire d'analyse	5
10.1 Préparation des échantillons.....	5
10.2 Dosage de la vitellogénine.....	5
11 Rapport d'essai	11
Annexe A (informative) Exemples de résultats: technique ELISA en sandwich sur viron à tête-de-boule	13
Bibliographie	20

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO 23893-3 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 5, *Méthodes biologiques*.

L'ISO 23893 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Qualité de l'eau — Mesurages biochimiques et physiologiques sur poisson*.

- *Partie 1: Échantillonnage des poissons, manipulation et conservation des échantillons*
- *Partie 2: Dosage de l'éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD) [Spécification technique]*
- *Partie 3: Dosage de la vitellogénine*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 23893-3:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/23893-3-2013>

63099ae98903/iso-23893-3-2013

Introduction

La vitellogénine (Vtg) est une phospho-lipo-glyco-protéine de grande taille produite en tant que précurseur des protéines du jaune d'œuf dans le foie des vertébrés ovipares, tels que les poissons. La Vtg est sécrétée par les hépatocytes par la voie sécrétoire, pénètre dans la circulation sanguine d'où elle est captée par l'ovocyte en croissance. Les concentrations de Vtg plasmatique sont normalement une indication de l'état de maturité des poissons femelles; se reporter aux Références [2] [18]. Il y a plus de dix ans, plusieurs études ont démontré que les poissons mâles pêchés dans les rivières et les cours d'eau présentaient des concentrations élevées de Vtg plasmatique (voir par exemple les Références [14] [23]), provoquées par des produits chimiques présents dans l'environnement, agissant comme des œstrogènes. Depuis, de nombreuses études ont montré que la Vtg chez le poisson était un biomarqueur extrêmement sensible pour les composés œstrogéniques aussi bien dans des cultures d'hépatocytes *in vitro* que dans des études *in vivo* en aquarium et des études sur le terrain; se reporter aux Références [1] [2] [10] [13] [16] [20] [26]. Par conséquent, la Vtg chez le poisson est devenue un biomarqueur accepté de l'exposition aux xéno-œstrogènes et anti-œstrogènes des produits chimiques, des effluents et des rejets, et a été proposée dans les essais des produits chimiques et les programmes de surveillance de l'environnement; voir par exemple la Référence [13].

Toutefois, de récentes analyses génétiques et immunologiques ont démontré une multiplicité générale des formes de Vtg chez le poisson, Références [9] [10]. Les concentrations circulantes de protéines Vtg (ou des produits de transcription du gène Vtg) pendant l'ovogénèse et leur degré d'induction par les œstrogènes semblent varier entre les espèces et entre les différents types de Vtg au sein d'une espèce. La cinétique d'induction des différents types de Vtg par les œstrogènes chez le poisson semble dépendre de facteurs environnementaux (par exemple la température de l'eau et la photopériode), de l'étape du cycle biologique, du sexe et de la concentration et du type de composé œstrogénique. Sur la base de ces découvertes, il est important de démontrer que les Vtg cibles utilisées dans une analyse biologique des œstrogènes dans une espèce spécifique sont une forme sensible aux œstrogènes et que l'analyse est validée avec les espèces considérées avant de lancer un programme de surveillance (Référence [10]).

La littérature scientifique contient une multitude de publications sur les procédures permettant de doser la Vtg dans des échantillons de poisson, à l'aide de dosages immunologiques. Alors que les dosages radio-immunologiques (RIA) constituaient la méthode prédominante dans les années 1980 et au début des années 1990 (voir par exemple les Références [4] [29]), les tests ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays) sont aujourd'hui majoritaires. Les techniques ELISA en sandwich et par compétition fournissent toutes les deux des résultats sensibles sans utiliser d'isotopes radioactifs et ont été appliquées avec succès à la détermination des concentrations de Vtg chez plusieurs espèces de poisson, par exemple voir Références [3] [6] [8] [12] [15] [17] [19] [21] [22] [24] [25] [27] [28] [31] [32].

La présente partie de l'ISO 23893 présente un protocole général pour les deux techniques ELISA, en sandwich et par compétition, en vue de leur utilisation pour quantifier la Vtg dans des échantillons de plasma sanguin de poisson. L'application de méthodes normalisées est fortement recommandée dans les programmes de surveillance.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 23893-3:2013](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/892154d3-9f09-43fa-bbfa-63099ae98903/iso-23893-3-2013)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/892154d3-9f09-43fa-bbfa-63099ae98903/iso-23893-3-2013>

Qualité de l'eau — Mesurages biochimiques et physiologiques sur poisson —

Partie 3: Dosage de la vitellogénine

AVERTISSEMENT — Il convient que les utilisateurs du présent document soient familiers des pratiques courantes de laboratoire. Le présent document n'a pas pour objectif de traiter tous les éventuels problèmes de sécurité associés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur du présent document d'établir des pratiques appropriées en matière de sécurité et d'hygiène et de s'assurer de leur conformité à la réglementation nationale en vigueur.

IMPORTANT — Il est absolument essentiel que les essais réalisés conformément au présent document soient effectués par un personnel ayant une qualification adéquate.

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 23893 spécifie une méthode permettant de mesurer les concentrations de vitellogénine (Vtg) dans un échantillon de plasma de poisson en employant une technique ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Elle s'applique à des poissons prélevés dans l'environnement (eau douce, eau d'estuaire ou eau salée) et à des poissons exposés à des substances ou des effluents en laboratoire. La méthode est quantitative lorsqu'elle utilise des anticorps anti-Vtg et un étalon de Vtg bien caractérisé avec l'espèce considérée.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/892154d3-9f09-43fa-bbfa-63099ae98903/iso-23893-3-2013>

2 Références normatives

Les documents suivants, en tout ou partie, sont référencés de manière normative dans le présent document et sont indispensables pour son application. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 23893-1, *Qualité de l'eau — Mesurages biochimiques et physiologiques sur poisson — Partie 1: Échantillonnage des poissons, manipulation et conservation des échantillons*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

3.1 limite de détection

LD

plus faible teneur pouvant être mesurée avec une certitude statistique raisonnable

EXEMPLE La LD est souvent exprimée comme la valeur du blanc réactif plus trois fois l'écart-type du blanc de réactifs.

Note 1 à l'article: La LD est également déterminée en tenant compte du facteur de dilution de l'échantillon dans le calcul.

3.2 limite de quantification LQ

teneur supérieure ou égale au point de plus faible concentration de la courbe d'étalonnage

EXEMPLE La LQ est souvent exprimée comme le blanc réactif plus dix fois l'écart-type du blanc de réactifs (Référence [11]).

Note 1 à l'article: La LQ est également déterminée en tenant compte du facteur de dilution de l'échantillon dans le calcul.

3.3 blanc de matrice échantillon représentatif ne contenant pas de niveaux détectables d'analyte

Note 1 à l'article: Pour les besoins de la présente partie de l'ISO 23893, l'analyte est la vitellogénine.

3.4 sélectivité aptitude à mesurer avec exactitude l'analyte en présence de composants pouvant être attendus dans la matrice

Note 1 à l'article: Pour les besoins de la présente partie de l'ISO 23893, l'analyte est la vitellogénine et la matrice est le plasma.

Note 2 à l'article: La sélectivité est démontrée en utilisant des «blancs matrice».

4 Principe

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Des échantillons de plasma sanguin de poisson sont prélevés essentiellement comme spécifié dans l'ISO 23893-1, mais en ajoutant toutefois un inhibiteur de protéase (voir 7.13 et 9.2). La vitellogénine est dosée par une technique immunologique fondée sur les anticorps, en utilisant l'une des deux variantes établies.

Dans la première, appelée ELISA en sandwich, on laisse réagir l'échantillon de plasma sanguin avec un anticorps de capture spécifique de la Vtg (provenant de la même espèce ou d'une espèce étroitement apparentée) dans une plaque de microtitrage recouverte d'anticorps. Un anticorps anti-Vtg de détection marqué par une enzyme est ensuite utilisé pour produire un «sandwich» d'anticorps qui peut être détecté sur la base d'un substrat chromogène du marqueur enzymatique (par exemple peroxydase du raifort). Un deuxième anticorps marqué par une enzyme peut également être utilisé pour développer le dosage si l'anticorps de détection n'est pas marqué. Une série d'étalons basée sur un matériau de référence purifié (protéine Vtg provenant de la même espèce ou d'une espèce étroitement apparentée) est utilisée pour établir une relation quantitative entre le signal de l'échantillon et la quantité d'étalon.

La deuxième variante est la technique ELISA par compétition, dans laquelle la Vtg de l'échantillon et la Vtg purifiée appliquée sur les parois de la plaque de microtitrage sont en compétition pour se lier à un anticorps anti-Vtg (marqué ou non) en solution. Le développement du signal de dosage suit le même principe que dans la technique en sandwich, bien que la série d'étalons produise une relation inverse avec l'intensité du signal.

Dans ce protocole, il convient d'utiliser uniquement les anticorps anti-Vtg ou dosages qui se sont avérés répondre aux critères de performance spécifiés avec les espèces de poisson étudiées.

5 Critères minimaux de performance

Il convient de considérer les critères énumérés ci-dessous comme les performances minimales acceptables, telles que définies du point de vue de l'utilisateur, dans le but de réaliser un dosage de Vtg.

Des critères de performance spécifiques doivent être établis pour chaque dosage spécifique devant être utilisé dans l'étude, sur la base des performances en interne (intralaboratoires).

Sélectivité:	Blanc de matrice < LD (avec le facteur de dilution nécessaire pour éviter les effets de matrice)
Étalonnage:	Étendue de mesure de la courbe d'étalonnage > 10 fois, de préférence 50 fois à 100 fois, pour être pratique avec la gamme dynamique des concentrations de Vtg observées
Taux de récupération:	> 50 %

NOTE La caractérisation de l'«effet de matrice» est un défi important à cet égard. Il peut être difficile de s'assurer qu'un échantillon de «blanc de matrice» ne contient réellement pas de Vtg.

6 Environnement d'essai

Toutes les opérations de manipulation des échantillons de plasma et des étalons, y compris le mesurage, doivent être réalisées à une température de (4 ± 2) °C ou sur de la glace pilée, sauf indication contraire dans le mode opératoire.

7 Réactifs

Sauf spécification contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue.

7.1 **Acide sulfurique**, 0,3 mol/l ou 1,5 mol/l, solution d'arrêt.

7.2 **Glace pilée.** <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/892154d3-9f09-43fa-bbfa-63099ae98903/iso-23893-3-2013>

7.3 **Tampon de revêtement**, 50 mmol/l de carbonate-bicarbonate, pH 9,6.

7.4 **Tampon de lavage**, solution saline tamponnée au tampon phosphate salin (PBS), pH 7,3, contenant 0,5 g/l de détergent polysorbate 20.

7.5 **Tampon de blocage**, tampon de lavage contenant 10 g/l d'albumine sérique bovine (BSA).

7.6 **Tampon de dilution**, 10 g/l de BSA dans une PBS.

7.7 **Tampon de substrat**, tampon phosphate-acide citrique, pH 5,0.

7.8 **Échantillon de Vtg de référence**¹⁾.

7.9 **Anticorps de capture**, anti-Vtg monoclonal ou polyclonal¹⁾.

7.10 **Anticorps de détection**, anti-Vtg monoclonal ou polyclonal¹⁾, non conjugué ou conjugué à une peroxydase du raifort (HRP). Lorsque l'anticorps de détection n'est pas conjugué, il doit être récolté sur d'autres espèces que l'anticorps de capture.

7.11 **Anticorps secondaire**²⁾, anticorps du Fc (Fragment cristallisable) de l'anticorps de détection, conjugué à une HRP.

1) Les échantillons de Vtg de référence, les anticorps monoclonaux ou polyclonaux, et les kits de dosage complets (kits Vtg ELISA) sont disponibles dans le commerce.

2) Les anticorps secondaires marqués par une enzyme sont disponibles dans le commerce.

7.12 Substrat peroxydase, tétraméthylbenzidine (TMB), ou *ortho*-phénylènediamine (OPD) + H₂O₂.

7.13 Inhibiteur de protéase, tel que l'aprotinine.

8 Appareillage

8.1 Plaques de microtitrage à 96 puits, transparentes, à fond plat, absorbantes.

8.2 Plaques de microtitrage à 96 puits, transparentes, à fond plat, non absorbantes, pour la technique ELISA par compétition.

8.3 Film d'étanchéité pour microplaques.

8.4 Lecteur de microplaque, longueur d'onde de 450 nm ou 490 nm, selon le substrat utilisé.

8.5 Pipettes, avec embouts jetables, 5 µl à 1 000 µl.

8.6 Pipette multicanaux et réservoir de réactif. Une pipette à répétition avec des embouts jetables (100 µl) peut également être utilisée.

8.7 Tubes à essai, 1 ml à 50 ml.

8.8 Dispositif de lavage de microplaques. Un dispositif de lavage de plaques, automatique ou manuel, est recommandé, mais une pissette compressible ou une pipette multicanaux/à répétition peut également être utilisée.

8.9 Agitateur-mélangeur vortex.

iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)

ISO 23893-3:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/892154d3-9f09-43fa-bbfa-63099ae98903/iso-23893-3-2013>

9 Mode opératoire d'échantillonnage

9.1 Échantillonnage des poissons

Il convient de réaliser l'échantillonnage dans le milieu naturel par pêche ou dans un laboratoire, sur des poissons exposés aux substances ou effluents, comme spécifié dans l'ISO 23893-1. Prélever un échantillon comprenant au moins 10 poissons de la même espèce, du même sexe et de taille homogène dans chaque groupe à examiner pour les concentrations de Vtg. Ne pas prélever d'échantillons pendant la période du frai car le comportement et les activités physiologiques des poissons peuvent être modifiés par l'activité sexuelle (à moins que ces aspects ne fassent partie du plan d'étude).

Compte tenu des facteurs susceptibles d'influencer les concentrations de Vtg, les conditions suivantes doivent être déterminées et consignées dans le rapport d'essai:

- a) température de l'eau;
- b) date;
- c) heure de la journée;
- d) description générale de l'état de santé de chaque poisson (sexe, longueur, masse corporelle, présence de lésions externes et internes) — ces éléments sont généralement consignés en relation avec l'échantillonnage, tel que décrit dans l'ISO 23893-1.

Selon les objectifs de l'étude, s'assurer que les poissons témoins (provenant du site de référence ou du groupe témoin de l'étude) soient prélevés dans un environnement de bonne qualité écologique. Manipuler

les poissons témoins et leurs échantillons de la même manière que ceux provenant des groupes étudiés ou traités expérimentalement, excepté pour l'exposition à la (aux) substance(s) étudiée(s).

9.2 Échantillonnage du plasma sanguin

Après la pêche ou à la fin de l'exposition, les poissons sont tués et le sang est prélevé tour à tour sur chaque poisson dès son retrait de l'eau, essentiellement de la manière spécifiée dans l'ISO 23893-1. Il convient de prélever un échantillon de sang, d'un volume d'environ 20 µl à 100 µl ou plus, sur chaque poisson, dès que possible après son sacrifice. L'échantillon de sang est prélevé à l'aide d'une seringue héparinisée idéalement dans la veine caudale ou par ponction cardiaque. Les échantillons de sang doivent être traités directement pour obtenir du plasma sanguin en centrifugeant les fioles à 3 000 × *g* pendant 10 min à 4 °C (ou 7 000 × *g* pendant 3 min), et le surnageant obtenu (plasma) est recueilli et divisé en aliquotes. L'échantillon de plasma est immédiatement transféré dans des fioles enduites d'un inhibiteur de protéase (par exemple aprotinine à 2 unités d'inhibiteur de trypsine [TIU]/ml).

Mode opératoire alternatif sur homogénat entier (WBH) (voir note): Homogénéiser le foie ou le corps entier dans un tampon d'échantillon froid [1+2 poids+volume; PBS, 10 g/l BSA avec 2 TIU/ml d'aprotinine] jusqu'à ce que les tissus soient finement broyés, en utilisant par exemple un homogénéisateur manuel en verre, volume 7 ml.

NOTE Lorsque l'on utilise des espèces de poisson de petite taille (par exemple medaka, poisson zèbre) ou des larves ou alevins de plus gros poissons, il peut être impossible d'obtenir un volume de plasma suffisant pour doser la Vtg. Dans ce cas, le foie ou l'homogénat de corps entier (WBH) peut être préparé et utilisé à la place (voir les Références [9] [10]).

9.3 Conservation des échantillons de plasma sanguin

Si le dosage de la Vtg ne peut pas avoir lieu le même jour que l'échantillonnage, les échantillons de plasma doivent être congelés immédiatement à une température inférieure à -70 °C, par exemple en utilisant de l'azote liquide ou de la glace sèche. Les échantillons peuvent alors être conservés pendant 12 mois dans l'azote liquide ou à une température inférieure à -70 °C.

Si le dosage de la Vtg doit être commencé le jour de l'échantillonnage, l'étape préparatoire doit alors débuter dans l'heure qui suit et les échantillons de plasma doivent être conservés à une température inférieure ou égale à 4 °C.

10 Mode opératoire d'analyse

10.1 Préparation des échantillons

La Vtg est une molécule instable et il convient de préparer et de conserver sur de la glace toutes les dilutions d'échantillon et d'étalon. Avant de réaliser le dosage, une série de dilutions des échantillons doit être réalisée. Après décongélation des échantillons et de l'étalon de Vtg sur de la glace, au moins trois dilutions différentes de chaque échantillon et une série de dilutions au demi de l'étalon dans un tampon de blocage/dilution sont préparées. Il convient que le niveau de dilution des échantillons couvre approximativement la gamme de 1→50 à 1→500 000 et que la série de dilutions de l'étalon comprenne 9 à 11 étapes de dilution.

10.2 Dosage de la vitellogénine

10.2.1 Étalonnage

Réaliser un étalonnage en utilisant un échantillon de Vtg de référence purifié. L'échantillon de référence est utilisé pour établir une courbe d'étalonnage par rapport à laquelle les échantillons inconnus sont quantifiés. La Vtg est une molécule instable et il convient de préparer et de conserver sur de la glace toutes les dilutions d'échantillon et d'étalon. Une Vtg reconstituée ne peut pas être congelée et réutilisée

quantitativement à une date ultérieure. Dans chaque dosage, il convient d'utiliser une série de dilutions (par exemple 2 ng/ml à 1 000 ng/ml) préparée à partir de l'étalon de Vtg fraîchement reconstitué.

10.2.2 Mode opératoire de dosage 1 – ELISA en sandwich

Les modes opératoires de dosage 1 et 2 décrits reflètent les principes généraux de la méthode ELISA. Selon les espèces et l'origine des anticorps ou des étalons utilisés, les conditions expérimentales peuvent varier, notamment le temps d'incubation, la composition du tampon et la dilution des échantillons et de l'étalon.

Dans la technique ELISA en sandwich, les puits des microplaques sont préalablement recouverts d'un anticorps de capture spécifique qui se lie à la Vtg contenue dans l'étalon et les échantillons introduits dans les puits. Un anticorps de détection différent et spécifique de la Vtg est ajouté pour créer un sandwich de Vtg et d'anticorps. La réalisation de l'ensemble du mode opératoire prend 2 jours.

Ce mode opératoire ne s'applique pas aux kits. Si des kits disponibles dans le commerce sont utilisés, suivre les instructions du fabricant.

10.2.2.1 Pré-induction des plaques absorbantes

A moins que des plaques pré-enduites d'un anticorps anti-Vtg approprié ne soient vendues par un fournisseur, une pré-induction doit être effectuée avant le jour du dosage.

Diluer l'anticorps de capture dans un tampon de revêtement à 10 µg/ml (12 ml requis par plaque).

Introduire 100 µl de cette solution dans tous les puits de toutes les plaques devant être utilisées.

Recouvrir les plaques d'un film d'étanchéité pour microplaques afin d'empêcher l'évaporation et laisser incuber à 4 °C pendant une nuit.

Après la nuit d'incubation, laver les puits trois fois avec 200 µl de tampon de lavage par puits.

Bloquer les sites de liaison non spécifiques en introduisant 200 µl de tampon de dilution dans chaque puits et laisser reposer pendant 1 h à 4 °C.

Vider les puits et retourner la plaque sur un papier absorbant.

10.2.2.2 Incubation avec les échantillons d'étalon et les échantillons dilués

Lorsque plusieurs plaques sont utilisées dans le dosage, ajouter des dilutions d'étalon et des dilutions d'échantillons sur une plaque avant de passer à la plaque suivante.

Voir le schéma de plaque proposé à la [Figure 1](#).

Introduire 100 µl de tampon de dilution dans chacun des deux puits de liaison non spécifique (NSB). Il convient d'inclure des puits NSB dans chaque plaque. Ces puits servent à déterminer la liaison non spécifique (signal de fond non spécifique).

Ajouter en double 100 µl de chaque dilution d'étalon de Vtg (S1 à S11).

Ajouter en double 100 µl de chaque dilution d'échantillon (P1 à P36).

Sceller les plaques et laisser incuber à une température ambiante de 20 °C à 25 °C pendant 1,5 h.

Lorsque plusieurs plaques sont utilisées, veiller à respecter le même temps d'incubation car l'ajout des étalons et des échantillons prend souvent plusieurs minutes. En cas de différence de temps significative entre les plaques, elles peuvent être synchronisées à ce stade: après 1,5 h d'incubation, laver la plaque (étape 8 ci-dessous), la sceller et la laisser reposer à température ambiante jusqu'à ce que toutes les plaques aient été lavées. Procéder ensuite à l'addition d'anticorps de détection.