

ETALONNAGE EN TRANSMISSION SPECTRALE DE FILTRES POUR LECTEUR DE MICRO-PLAQUE ELISA

J. Voyer, J. Dubard, J. Hameury, J-R. Filtz
Laboratoire National de Métrologie et d'Essais (LNE)
Division Métrologie Thermique et Optique
29 Avenue Roger Hennequin
78197 Trappes Cedex

Résumé

Les laboratoires d'analyse utilisent des instruments optiques tels que des lecteurs de micro-plaque pour effectuer des analyses biologiques et bactériologiques dans les domaines de la santé, de l'agroalimentaire et de l'environnement.

Les besoins de traçabilité conduisent à étalonner le jeu de filtres intégrés dans des plaques test qui permettent de vérifier les performances des lecteurs de micro-plaques.

Le LNE a développé des moyens pour étalonner en transmission spectrale le jeu de filtres tenant compte de leurs caractéristiques géométriques particulières.

Le premier dispositif est un spectrophotomètre industriel à double faisceau, le deuxième consiste en une adaptation du banc de mesure de la sensibilité spectrale de détecteurs fonctionnant en mono faisceau. Ces deux dispositifs sont utilisés pour étalonner les filtres en transmission aux longueurs d'onde comprises entre 300 nm et 800 nm..

Abstract

Analysis laboratories use optical instruments such as micro-plates readers to perform biological and bacteriological analysis for health, food and environment industries.

The need for traceable measurements leads to the calibration of a set of filters included in a test plate. These filters are used to check the performances of the micro-plates readers.

LNE has developed means to address these needs. Spectral transmittance calibration are performed taking into account the specific geometries of the test plates.

One set-up is a commercial double-beam spectrophotometer, the second one is a transformation of a detector spectral responsivity calibration bench. These two set-ups are used to calibrate the filters on the spectral range 300 nm - 800 nm.

1. Introduction

ELISA « Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay » est une technique biochimique principalement utilisée en immunologie afin de détecter la présence d'un anticorps ou d'un antigène dans un échantillon. Cette technique utilise un appareil optique, lecteur de micro-plaque, associé à une plaque "test" pour la vérification de ces lecteurs. La plaque "test" comprend un jeu de filtres placé derrière un support

mécanique constitué d'une matrice de trous formant des puits de mesure.

Les plaques "test" pour la vérification des photomètres lecteurs de microplaques ELISA [1] intègrent des filtres, en verre, démontables ou non de leur support mécanique. Ces contraintes ont conduit le LNE à mettre en œuvre deux bancs d'étalonnage complémentaires [2-4] pour répondre aux besoins de mesure des filtres en transmission sur le domaine spectral ultraviolet et visible.

2. Etalonnage avec un spectrophotomètre

2.1. Principe

La méthode de mesure consiste à mesurer directement le rapport entre le flux incident et le flux transmis à travers l'éprouvette.

Pour ces mesures, le spectrophotomètre fonctionne en mode "double faisceau". La transmission du filtre est obtenue en faisant le rapport entre le signal "voie échantillon" et le signal "voie référence". Ce mode de fonctionnement permet de corriger les variations d'émission de la source et les variations de transmission de l'atmosphère sur le trajet optique du faisceau.

2.2. Instrumentation

L'appareil utilisé est un spectrophotomètre de marque Perkin-Elmer, modèle Lambda 900 (Figure 1). Le pilotage de l'instrumentation et les acquisitions sont gérés par le logiciel UV Winlab.

Les éléments principaux du spectrophotomètre sont :

- 2 sources de rayonnement (1 lampe deutérium et 1 lampe halogène),
- 1 monochromateur à réseaux double,
- 1 système optique mettant en forme le faisceau et permettant le fonctionnement en mode "double faisceau",
- 1 système de détection comprenant 2 détecteurs (un photomultiplicateur et un détecteur PbS refroidi).

Dans le compartiment échantillon un diaphragme limite la taille du faisceau afin d'être compatible avec la dimension du puits de la plaque "test".

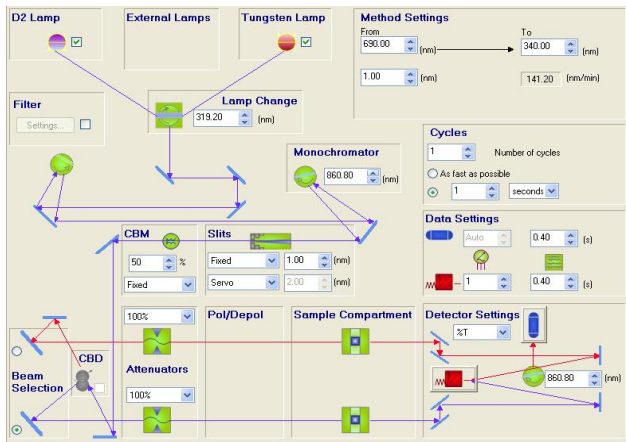


Figure 1: Schéma du spectrophotomètre

Un exemple d'enregistrement de spectre de transmission de filtre mesuré est présenté figure 2, les valeurs numériques étant enregistrées dans un fichier informatique.

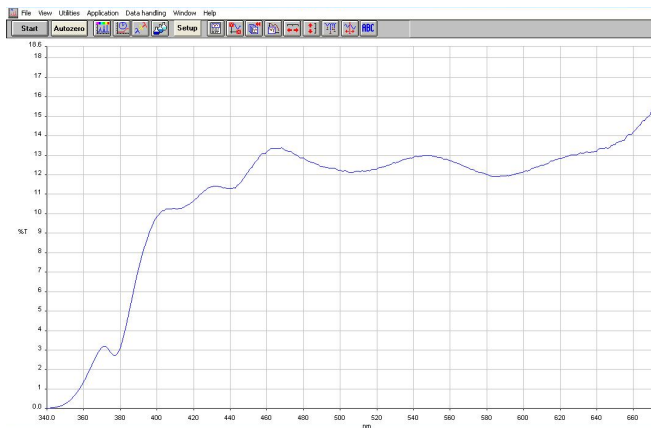


Figure 2: Spectre de transmission d'un filtre

3. Banc de mesure mono-faisceau

3.1. Principe

Le deuxième dispositif est une adaptation d'une installation d'étalonnage en sensibilité spectrale de détecteurs fonctionnant dans les domaines visibles et proches infrarouges. La transmission du filtre est obtenue en faisant le rapport entre le signal délivré par un détecteur recevant un faisceau lorsque le filtre est placé ou non sur le trajet du faisceau.

3.2. Instrumentation

Le banc de mesure de la sensibilité spectrale des détecteurs comprend une lampe tungstène-halogène couplée à un monochromateur à réseau simple permettant de générer un faisceau monochromatique (figure 3). Ce faisceau est mis en forme avec un jeu de miroirs et un diaphragme. Le filtre est positionné sur le trajet du faisceau. La lumière transmise est focalisée sur un détecteur silicium à l'aide d'un miroir concave. Une platine de translation permet de positionner ou non le filtre sur le trajet du faisceau.

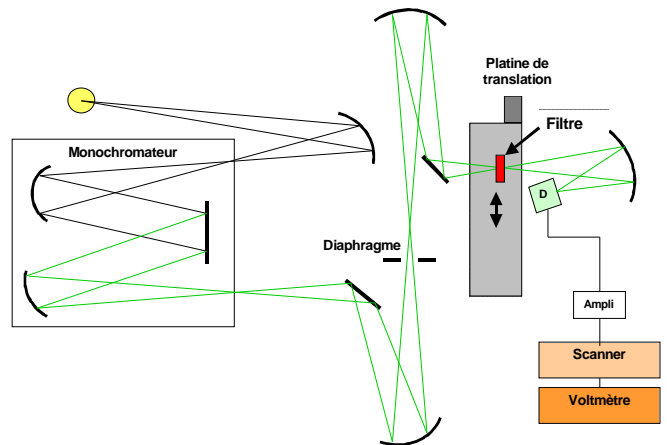


Figure 3 : Banc de mesure de filtres : configuration mono-faisceau

4. Evaluation des incertitudes

Les causes d'incertitudes sont identiques pour les deux bancs et l'évaluation des différentes composantes est réalisée de manière similaire. Nous présentons en détail l'évaluation des incertitudes pour le spectrophotomètre à double faisceaux.

Instabilités temporelles des faisceaux.

Les mesures sont faites en mode "double faisceau" et les trajets optiques du faisceau "échantillon" et du faisceau "référence" sont sensiblement identiques. Le fonctionnement en mode "double faisceau" atténue donc fortement les conséquences des instabilités de la source et des variations de transmission de l'atmosphère (les deux voies varient simultanément).

En conséquence, l'incertitude sur la transmission spectrale mesurée due aux instabilités des faisceaux est prise en compte dans la répétabilité.

Incertitude sur la longueur d'onde.

La justesse de l'échelle spectrale a été caractérisée en mesurant les positions spectrales d'un filtre holmium et d'un filtre didymium. Elle est égale à 0,25 nm. L'incertitude-type sur la transmission spectrale mesurée due à l'incertitude sur la longueur d'onde est donnée par la relation

$$U_{\text{échelle spectrale}}(\tau) = \frac{\partial \tau}{\partial \lambda} \cdot 0.25 \text{ nm} \quad (1)$$

La dérivée $\frac{\partial \tau}{\partial \lambda}$ est calculée à partir des points expérimentaux situés de part et d'autre de la longueur d'onde concernée.

Incertitude due à la largeur de la bande spectrale d'analyse.

L'incertitude due à la largeur spectrale n'est en règle générale pas prise en compte. En revanche, la largeur de la bande spectrale utilisée pour la mesure est indiquée dans le document délivré à l'issue de la mesure.

Incertitude due aux conditions géométriques de mesure

Les conditions pouvant avoir une influence sur le résultat sont :

- la surface analysée,
- l'angle d'incidence,
- l'ouverture du faisceau incident,
- l'ouverture du faisceau collecté.

L'influence de chacun de ces paramètres et par conséquent les incertitudes associées ne peuvent pas être quantifiées a priori et dépendent principalement du filtre à étalonner.

Les conditions géométriques de mesure sont indiquées dans le document délivré à l'issue de la mesure.

En règle générale, l'incertitude due aux paramètres géométriques est supposée négligeable.

Conditions environnementales

Les principaux paramètres environnementaux ayant une influence sur les résultats sont :

- la température et l'humidité du local,
- les vibrations mécaniques de la partie optique du spectrophotomètre.

Le spectrophotomètre est placé dans un local à atmosphère régulée en température et humidité. Les intervalles de variation de la température et de l'humidité sont relativement faibles (± 2 °C et ± 10 HR %).

Le spectrophotomètre est mis en fonctionnement 2 heures avant la réalisation des mesures. Les conditions d'environnement sont précisées dans le document délivré à l'issue de la mesure et l'incertitude due aux conditions environnementales est négligeable car les filtres ne présentent pas de thermochromisme aux longueurs d'onde de mesure.

Le spectrophotomètre est placé sur une table optique massive. On estime que les incertitudes résiduelles dues aux vibrations sont intégrées dans les incertitudes de reproductibilité.

Bruits de mesure - Reproductibilité

Des séries de mesures de transmission ont été faites à des dates différentes sur des filtres "étalons" et également sans filtre (transmission = 100%) et en obturant le faisceau (transmission = 0%). La figure 4 présente les dispersions entre les résultats obtenus pour chaque filtre et chaque longueur d'onde.

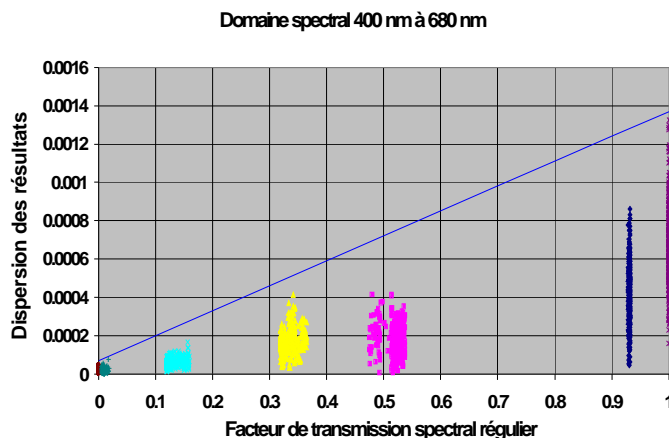


Figure 4 : Reproductibilité des mesures : dispersion des résultats.

L'incertitude-type due aux bruits est donnée par la relation suivante pour le domaine spectral 400 nm à 680 nm :

$$u_{repro} = (0.0001 + 0.0013 * \tau_{\lambda}) / 2 \quad (2)$$

Incertitude liée à la lumière parasite.

Elle est inférieure à 10^{-4} , nous la considérons donc négligeable.

Incertitude liée aux erreurs de justesse en transmission du spectrophotomètre et à l'étalonnage des filtres étalons

Le LNE dispose de plusieurs filtres "étalons" régulièrement étalonnés en transmission spectrale régulière au LNE-INM.

Les écarts entre des valeurs mesurées par le LNE et les valeurs de référence mesurées par le LNE-INM ont été calculées. La figure 5 présente les écarts entre les deux laboratoires en fonction du facteur de transmission régulier spectral pour le domaine spectral 360 nm à 800 nm. Les résultats du LNE sont les moyennes de 3 ou 4 séries de mesures.

Etant donné que les écarts observés ne présentent pas de caractère systématique, nous choisissons de ne pas faire de correction de justesse et d'intégrer ces écarts dans le bilan d'incertitude.

L'incertitude d'étalonnage des filtres étalons $u_{\text{étalonnage INM}}$ est extraite des certificats fournis par le LNE-INM. Elle est prise en compte pour le calcul de l'incertitude u_{justesse} .

$$u_{\text{justesse}} = \sqrt{\left(\frac{\Delta_{\text{justesse}}}{2}\right)^2 + (u_{\text{étalonnage INM}})^2} \quad (3)$$

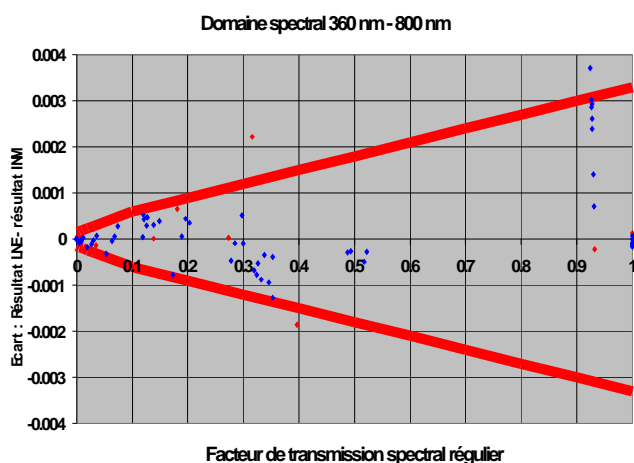


Figure 5 : Ecart de justesse du spectrophotomètre

Incertitude composée sur la transmission spectrale régulière

L'incertitude-type composée pour la transmission spectrale régulière obtenue à partir d'une mesure unique (un seul spectre) est donnée par la relation :

$$u_c = \sqrt{\sum (u_{\text{composante}})^2} + \sum \text{autres incertitudes} \quad (4)$$

Elle est représentée sur la figure 6.

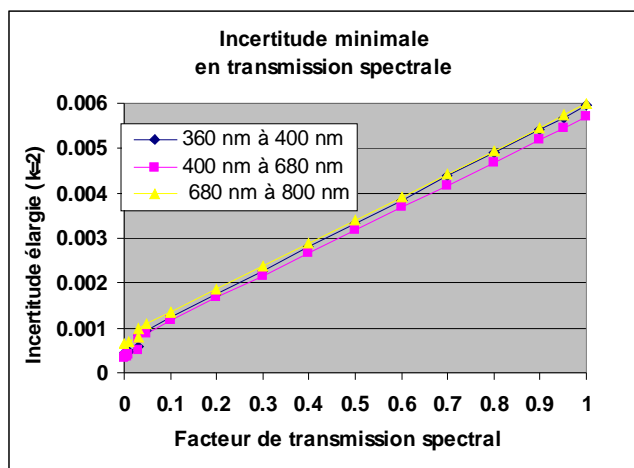


Figure 6 : Incertitude élargie ($k = 2$) sur la transmission régulière spectrale mesurée

La pratique dans le domaine des laboratoires d'analyses est d'exprimer les résultats en densité optique. A cette fin il convient de transformer simplement la transmission par la formule suivante :

$$D(\lambda) = -\log_{10}(\tau(\lambda)) \quad (5)$$

L'incertitude sur $\tau(\lambda)$ se propage à celle de D par la relation

$$u(D(\lambda)) = \frac{1}{\tau(\lambda) \cdot \ln(10)} * u_c(\tau(\lambda)) \quad (6)$$

La figure 7 représente les incertitudes exprimées en densité optique.

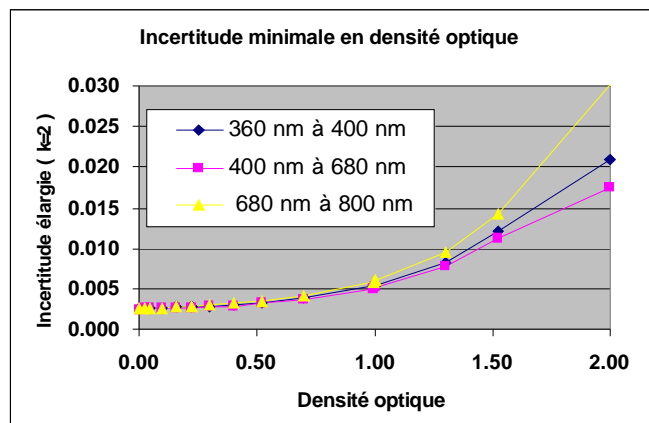


Figure 7 : Incertitude élargie ($k = 2$) sur la densité optique spectrale mesurée

5. Conclusion

Le LNE a mis en œuvre deux bancs complémentaires pour répondre au besoin d'étalonnage en transmission spectrale des plaques "test" pour les lecteurs de micro-plaque de type ELISA. Les caractéristiques mécaniques des filtres constituant les différents types de plaques test sont prises en considération. Le facteur de transmission ou la densité optique des filtres sont mesurés sur le domaine spectral 300 nm à 800 nm et les meilleures incertitudes sont de 0,0020 pour un filtre de densité 0,5 et de 0,018 pour un filtre de densité 2.

Références

- [1] Norme NF U47-019, Septembre 2000, Guide de bonnes pratiques pour la mise en œuvre des techniques ELISA
- [2] Technical report CIE 130 "Practical methods for the measurement of reflectance and transmittance", Commission International de l'Eclairage, 1998.
- [3] "Pratique des mesures spectrophotométriques par transmission", J. Gaudemer, J. Voyer, proceedings 8ème Congrès International de Métrologie, Besançon, France, pp 243-246
- [4] "Mesure des facteurs de transmission de filtres optiques au BNM-INM", P. Lecollinet, J. Bastie, proceedings 8ème Congrès International de Métrologie, Besançon, France, pp 343-348.