

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA 036 - Version 2

Juin 2018

Détection des souches responsables de la maladie de Moko et des variants IIB-4NPB dans le complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum*, sur *Musa* spp. et dans l'eau

Laboratoire de la Santé des Végétaux

Laboratoire national de référence « Bactéries sur bananier, agrumes et plantes tropicales »



Historique de la méthode

Une méthode est mise à jour afin de prendre en compte des modifications.

Une modification est qualifiée de majeure lorsqu'elle concerne le processus analytique, le domaine d'application ou des points critiques de la méthode, dont la prise en compte peut modifier les performances de la méthode d'analyse et/ou les résultats. Une modification majeure induit des adaptations. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation, totale ou partielle.

Une modification est qualifiée de mineure si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Une modification mineure est sans influence sur les performances de la méthode et ne requiert pas une nouvelle validation.

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

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
v1*	Sans objet	Janvier 2015	Version initiale
v2**	Mineure	Juin 2018	<ul style="list-style-type: none">Mise au format Anses de la MOA 036 ; pas de modification sur le fond de la méthode.Ajout de la modalité de prélèvement d'échantillons dans l'eauMise à jour de la nouvelle classification d'espèces pour les souches du complexe d'espèces <i>Ralstonia solanacearum</i>Correction de la composition du tampon de broyage TRIS

* La version 1 a fait l'objet d'une consultation du 08 décembre 2014 au 21 décembre 2014 sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.

** La version 2 a fait l'objet d'une consultation du 04 décembre 2017 au 04 janvier 2018 sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.



Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

Anses - Laboratoire de la Santé des Végétaux, Unité Ravageurs et agents pathogènes tropicaux.

Laboratoire National de Référence (LNR) pour la détection des bactéries sur plantes tropicales.

Adresse : 7 chemin de l'Irat, Ligne Paradis, 97410 Saint Pierre, Ile de la Réunion.

Contact : saint-pierre.lsv@anses.fr

Les travaux méthodologiques effectués sur la méthode ont donné lieu à un rapport de validation (10/10/2016). Le rapport de validation, ainsi que la méthode ont été revus par des pairs scientifiques, ainsi que l'unité de coordination de la référence du LSV.



Sommaire

Avant-propos	3
Introduction	6
Avertissements et précautions de sécurité	7
1. Objet et domaine d'application	8
2. Documents de référence	8
3. Termes, sigles et définitions	9
4. Principe de la méthode	9
5. Réactifs	11
5.1 Eau.....	12
5.2 Réactifs de biologie moléculaire	12
5.2.1 Master mix	12
5.2.2 Oligonucléotides	12
5.3 Tampons	13
5.4 Milieux de culture.....	13
5.5 Autres réactifs et consommables.....	13
5.6 Contrôles et témoins.....	13
5.6.1 Test spécifique de détection sur broyat végétal ou sur filtrât d'eau par duplex PCR conventionnelle 93F/R & 5F/R	14
5.6.2 Test d'isolement clé sur milieu gélosé.....	14
5.6.3 Test d'identification par PCR conventionnelle (duplex 93F/R & 5F/R et simplex Oli1/Y2) sur souches isolées appartenant au complexe d'espèces <i>Ralstonia solanacearum</i> .	15
6. Appareillage et matériels	15
6.1 Broyeur.....	16
6.2 Thermocycleur pour PCR point final	16
6.3 Unité de filtration	16
7. Échantillons	16
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	16
7.2 Conservation des échantillons avant analyse	17
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse.....	18
8. Mode opératoire	19
8.1 Préparation des échantillons pour analyse	19
8.2 Filtration de l'échantillon de type eau sur membranes	19
8.3 Broyage de l'échantillon végétal	19



8.4 Test spécifique de détection par duplex PCR conventionnelle 93F/R & 5F/R sur broyat végétal ou filtrât d'eau	20
8.4.2 Mélange réactionnel	20
8.4.2 Dépôt des mélanges réactionnels	21
8.4.3 Cycles thermiques PCR	21
8.5 Test d'isolement clé sur milieu gélosé	21
8.6 Test général d'identification par simplex PCR (Oli1/Y2) des souches isolées appartenant au complexe d'espèces <i>Ralstonia solanacearum</i>	22
8.6.1 Préparation du mélange réactionnel	22
8.6.2 Dépôt des mélanges réactionnels	22
8.6.3 Cycles thermiques PCR	23
8.7 Test spécifique d'identification sur souches isolées par duplex PCR conventionnelle 93F/R & 5F/R appartenant à l'écotype Moko ou NPB du complexe d'espèces <i>Ralstonia solanacearum</i>	23
8.7.1 Mélange réactionnel	23
8.7.2 Dépôt des mélanges réactionnels	23
8.7.3 Cycles thermiques PCR	24
8.8 Électrophorèse et révélation	24
9. Résultats	24
9.1 Contrôle de la validité des résultats	24
9.1.1 Test spécifique de détection sur broyat végétal ou filtrât d'eau par duplex PCR conventionnelle 93F/R & 5F/R	24
9.1.2 Test d'isolement clé sur milieu gélosé	25
9.1.3 Test spécifique d'identification par duplex PCR conventionnelle 93F/R & 5F/R et test général d'identification par simplex PCR (Oli1/Y2) sur souches isolées du complexe d'espèces <i>Ralstonia solanacearum</i>	25
9.2 Calculs et expression des résultats	25
9.2.1 Test spécifique de détection sur broyat végétal ou filtrât d'eau par duplex PCR conventionnelle 93F/R & 5F/R	25
9.2.2 Test d'isolement clé sur milieu gélosé	25
9.2.3 Analyse et interprétation des résultats du test d'isolement clé sur milieu gélosé et de la détection sur broyat végétal ou filtrât d'eau par duplex-PCR 93F/93R & 5F/5R	26
9.2.4 Test général d'identification par simplex PCR (Oli1/Y2) des souches isolées appartenant au complexe d'espèces <i>Ralstonia solanacearum</i>	27
9.2.5 Formulation des résultats de biologie moléculaire 93F/93R & 5F/5R sur souche pure	28
9.3 Analyses de confirmation	28
10. Caractéristiques de performance de la méthode	29
Annexe 1 - Recette des milieux microbiologiques et tampons utilisés pour la détection des souches Moko et NPB du complexe d'espèces <i>Ralstonia solanacearum</i>	30
Bibliographie	32



Introduction

Le complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* (CeRs) comprend des agents bactériens responsables du flétrissement du bananier (*Musa* sp.). Il provoque des pertes importantes de production à travers le monde et son complexe d'espèces représente une menace pour l'agriculture. Ces souches pathogènes du bananier appartiennent à l'écotype Moko de l'espèce *R. solanacearum* dont le complexe d'espèces a récemment été divisé en trois espèces distinctes. L'écotype Moko a été caractérisé comme virulent sur Solanaceae en conditions contrôlées.

Phylogénétiquement très proches, les souches dites NPB (not pathogenic to banana), ayant émergé en Martinique en 2007, présentent une gamme d'hôte différente et sont non pathogènes du bananier. Elles sont par contre virulentes sur *Cucurbitaceae* et sur *Solanaceae*.

Le CeRs regroupe des organismes réglementés sur la liste A2 de l'OEPP et est donc considéré comme organisme de quarantaine OEPP présent en Europe sans y être largement disséminé. Il est notamment considéré comme organisme de quarantaine par les États-Unis d'Amérique.

La présente méthode s'appuie sur la directive européenne 2006-63-CE concernant la lutte contre *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et coll. ; ainsi que sur l'arrêté du 31 juillet 2000 établissant la liste des organismes nuisibles aux végétaux, produits végétaux et autres objets soumis à des mesures de lutte obligatoire, dans lequel les souches responsables de la maladie de la Moko sont citées comme organisme contre lequel la lutte est obligatoire, de façon permanente, sur tout le territoire des DOM.



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 en vigueur.

Il est essentiel que les manipulations conduites conformément à la présente méthode soient exécutés 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/suspicion) et isolat bactérien en résultant doivent être détruits par autoclavage ou autre moyen inactivant les bactéries.

Les consommables ayant été en contact avec le matériel végétal infecté (ou de statut indéterminé/suspicion) et les isolats bactériens en résultant doivent être détruits par autoclavage ou autre moyen inactivant les bactéries. Le matériel ayant été en contact avec le végétal infecté (ou de statut indéterminé/suspicion) et les isolats bactériens en résultant doit être désinfecté.



1. Objet et domaine d'application

Objet :

L'objet de cette méthode est de détecter la présence de souches du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* de l'écotype Moko à partir soit d'échantillon de bananier asymptomatique ou présentant des symptômes de flétrissement bactérien ; soit d'eau potentiellement contaminée par des souches du complexe d'espèces *R. solanacearum*.

Elle s'appuie sur la combinaison de différents tests :

1. Concentration des cellules cibles à partir de l'eau (non applicable aux matrices végétales) ;
2. Détection par PCR conventionnelles sur broyat ou sur filtrât d'eau ;
3. Isolement sur milieu gélosé semi-sélectif ;
4. Détection par PCR conventionnelles sur souches pures.

Domaine d'application :

Un test duplex PCR conventionnelle utilisant deux couples d'amorces dont la combinaison est spécifique des souches Moko et NPB du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* est proposé dans cette méthode.

La méthode s'applique soit sur des échantillons :

- Symptomatiques ou asymptomatiques frais de tissus végétaux de bananier (pseudotrunc). Un échantillon individuel découpé pour une masse de 2 g frais sera utilisé pour l'analyse et représentera la prise d'essai. La prise d'essai peut être aussi effectuée sur l'exsudat bactérien, qui serait éventuellement présent pour des échantillons symptomatiques ;
- D'eau pouvant provenir de rivières, de systèmes d'irrigation, de retenues collinaires... et pouvant présenter des particules en suspension. Un échantillon individuel d'un volume d'un litre sera utilisé pour l'analyse et représentera la prise d'essai.

2. Documents de référence

- [1] **MOA 022** : techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques : PCR (Polymerase Chain Reaction), RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) et PCR temps réel. Détection des organismes phytopathogènes.
- [2] **MOA GLO 001** : Glossaire des termes techniques en vigueur au Laboratoire de la santé des végétaux
- [3] **Rapport de validation (10/10/2016)** : rapport de caractérisation et de validation de la méthode de détection des souches Moko et NPB du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* sur parties végétatives de Musaceae et l'eau.XXXX



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...).

Le glossaire MOA GLO 001 reprend les principales définitions. L'attention des lecteurs est attirée sur le fait que les termes intégrés au glossaire ne sont, en règle générale, pas spécifiquement repérés dans le corps de la méthode d'analyse.

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

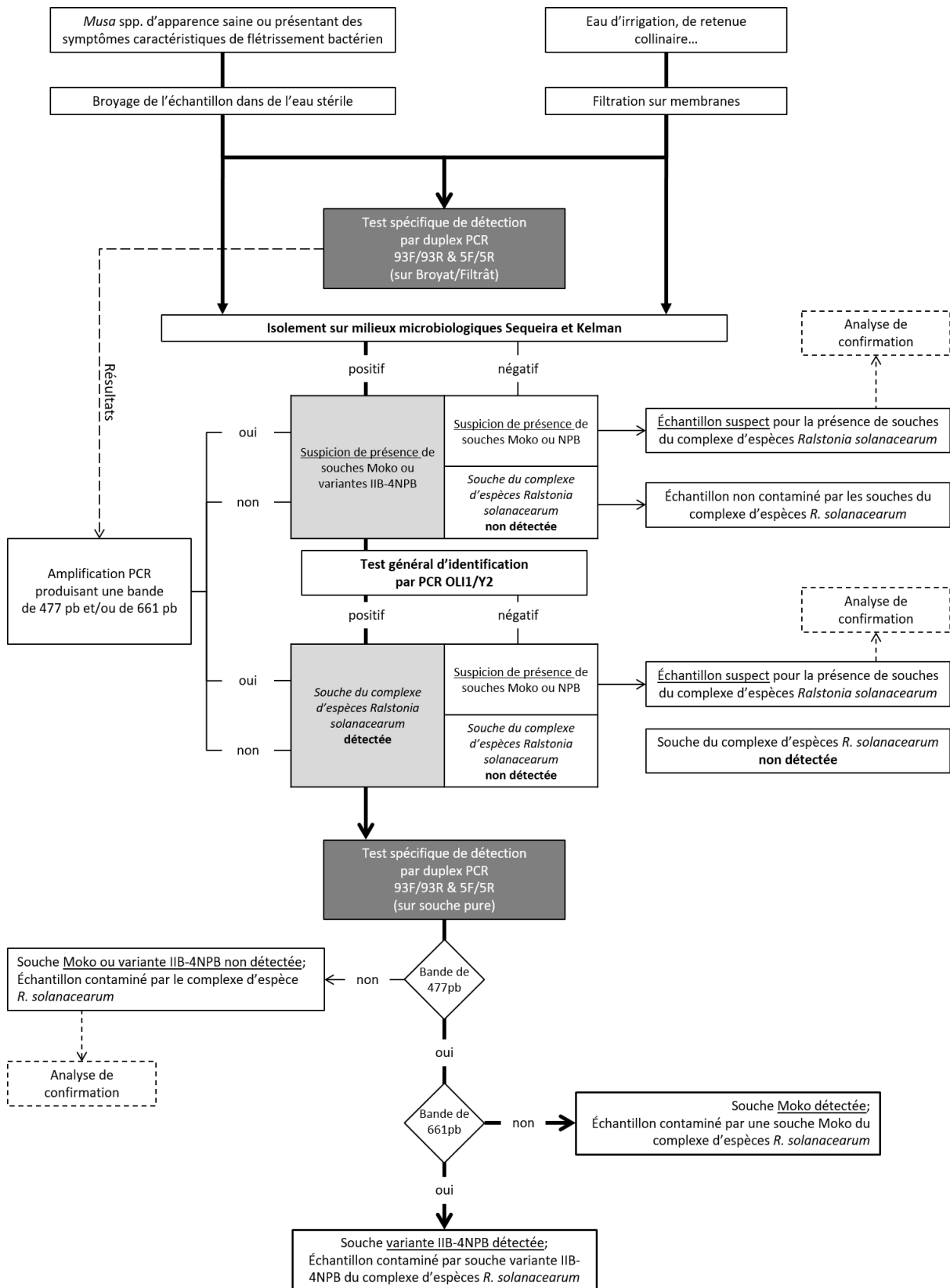
4. Principe de la méthode

Les tests composant la méthode présentée dans ce document sont qualitatifs, c'est à dire qu'ils donnent un résultat du type « positif » ou « négatif ». Un résultat positif indique la présence ou la suspicion de présence de l'organisme cible dans une quantité d'échantillon donnée et dans la limite du seuil de détection de la technique employée.

Un résultat négatif indique l'absence de l'organisme cible dans une quantité d'échantillon donnée et dans la limite du seuil de détection de la technique employée.



Ces tests s'intègrent dans le schéma de détection suivant :





Détection et identification des souches Moko et NPB

Les laboratoires mettant en œuvre la détection des souches Moko et NPB doivent réaliser les étapes de détection suivantes :

- Isolement sur milieu microbiologique gélosé et duplex-PCR conventionnelle 93F/R & 5F/R à partir du broyat végétal ou du filtrât d'eau sur membrane¹ ;
- Simplex-PCR OLI1/Y2 sur souches isolées (détection du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum*) ;
- Duplex-PCR conventionnelle 93F/R & 5F/R sur souches précédemment identifiées comme appartenant au complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum*.

Note : ¹ la duplex-PCR conventionnelle 93F/R & 5F/R réalisée à partir du broyat végétal ou du filtrât d'eau sur membrane permet une aide à la décision pour la lecture du milieu microbiologique gélosé, sur lequel certains contaminants pourraient nuire à la bonne interprétation des résultats.

Confirmation des souches Moko et NPB

L'analyse de confirmation est réalisée de préférence à partir du reliquat de la prise d'essai, à défaut à partir des autres reliquats pertinents. La présence des souches Moko et NPB est confirmée uniquement si *a minima* le test d'isolement suivi du test d'identification réalisés à partir des souches isolées sont positifs. Dans le cas où le test de biologie moléculaire appliqué sur extrait végétal est positif, mais que le test d'isolement est négatif, la suspicion de présence est confirmée, il est toutefois précisé que la bactérie-cible n'a pas pu être isolée. Dans tous les autres cas, la présence des souches Moko et NPB n'est pas confirmée.

5. Réactifs

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient 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 contamination (ADN ou ARN), de nucléase, d'inhibiteur 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 utilisée pour la préparation des tampons/milieus de culture ainsi que pour les étapes de préparation des échantillons (préparation des suspensions bactériennes) doit être de qualité « analytique » (*i.e.* déminéralisée, distillée, osmosée...) garantissant d'atteindre les critères de performance attendus pour les tests.

L'eau utilisée pour les étapes de PCR (préparation des mix, dilution des ampliâts) doit présenter une qualité suffisante pour une utilisation en biologie moléculaire (eau ultrapure).

5.2 Réactifs de biologie moléculaire

Certains réactifs sont critiques et conditionnent la performance des étapes d'extraction et d'amplification (kit d'extraction d'ADN, mastermix ou core kit commercial de polymérase thermostable, dNTP, amorces, sondes, eau de qualité ultrapure). Ces réactifs doivent être utilisés et, pour certains, contrôlés conformément à la méthode d'analyse MOA 022.

5.2.1 Master mix

Le protocole a été caractérisé et validé avec le mélange réactionnel du kit Gotaq® Hot Start Polymérase de Promega. Ce réactif n'étant plus produit, le mélange réactionnel du kit Gotaq® G2 Hot Start Polymérase (Promega) a également été testé et validé ; il peut être utilisé en remplacement. Dans ce kit, le tampon est disponible soit avec le tampon de charge déjà mélangé, soit sans le tampon de charge.

5.2.2 Oligonucléotides

Amorces utilisées dans l'amplification moléculaire spécifique par PCR conventionnelle pour la détection des souches du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* selon Seal et al. 1993.

Amorces	Séquence	Taille de l'amplicon (pb)	Cible
Oli1	GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC	288	Complexe d'espèces <i>R. solanacearum</i>
Y2	CCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT		

Amorces utilisées dans l'amplification moléculaire spécifique par duplex PCR conventionnelle 93F/R & 5F/R pour la détection des souches Moko et NPB du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* selon Cellier et al. 2015.

Amorces	Séquence	Taille de l'amplicon (pb)	Cible
93F	CGCTGCGCGGCCGTTTCAC	477	Souches Moko & IIB-4NPB
93R	CGGTCGCGGCATGGGCTTGG		
5F	GCGCGCGAGGCTGGTGATGT	661	Souches IIB-4NPB
5R	TGGGTTTCGAGGCGGACAGC		



5.3 Tampons

La liste des tampons nécessaires à la mise en œuvre de la méthode est la suivante :

- Tampon de broyage (TRIS – voir annexe 1) ;
- Tampon de migration (par exemple : TAE ou TBE) ;
- Tampon de charge (si celui-ci n'est pas intégré au tampon du master mix cf. §5.2).

5.4 Milieux de culture

Milieux de culture semi-sélectif Kelman et Sequeira (recette disponible en Annexe 1).

5.5 Autres réactifs et consommables

Consommables à usage unique

- Microcônes stériles à filtre de volumes adaptés ;
- Microtubes stériles de volume adapté ;
- Microtubes, barrettes ou plaques stériles pour PCR de volume adapté au thermocycleur utilisé.

Anses stériles.

Éthanol 70° (et éventuellement un produit détergent désinfectant de type Aniospray) : désinfection des surfaces de travail et du matériel lors des étapes de prise d'essai, de broyage et d'isolement.

Produits de décontamination de type DNA Away : désinfection des surfaces de travail et du matériel lors de la mise en œuvre des tests de biologie moléculaire.

5.6 Contrôles et témoins

La technique de détection de régions cibles d'ADN d'un organisme par la technique de PCR conventionnelle requiert l'utilisation d'une série de contrôles et témoins permettant de valider la bonne qualité de la manipulation. Ces contrôles et témoins ont différentes fonctions et leur utilisation permet de garantir que :

- l'opérateur a correctement suivi le protocole ;
- les consommables et réactifs utilisés étaient de qualité suffisante ;
- les volumes prélevés à l'aide des micropipettes, les températures et durées de réaction, la concentration et le pH des solutions utilisées étaient corrects ;
- l'extraction des souches de leurs milieu (plante ou eau) était suffisante en quantité et amplifiable (pas d'interférence avec des composés inhibiteurs) ;
- il n'y a pas eu de contamination accidentelle des échantillons testés.

Les souches suivantes sont recommandées comme souches de références : CFBP6925 (Molk2 ; phylotype IIB-3 ; écotype Moko) ; et CFBP6783 (ANT75 ; phylotype IIB-4NPB ; écotype NPB).

Note : les témoins positifs de processus peuvent servir aux différents tests tout au long du schéma de détection ; depuis le broyage ou filtration, puis pour les différentes PCR et isolement. Pour le broyat végétal, il est conseillé de doper 5 mL de broyat à l'aide d'une suspension bactérienne concentrée à environ 10^7 CFU/mL (densité optique de 0.1 à 650 nm) ; pour une eau il est conseillé de doper 1 L à l'aide de 100 μ L de cette même suspension.



5.6.1 Test spécifique de détection sur broyat végétal ou sur filtrât d'eau par duplex PCR conventionnelle 93F/R & 5F/R

- un **témoin négatif de processus** (TS) : matrice ne contenant pas l'organisme cible, traitée dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser, déclarée non contaminée à l'issue de la manipulation (pseudotrons de bananier non infectés ou eau stérile, selon la matrice de base à analyser).
- un **témoin positif de processus** (T+) : matrice contenant l'organisme cible, traitée dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser, déclarée contaminée à l'issue de la manipulation (pseudotrons de bananier infectés ou eau stérile dopée, selon la matrice de base à analyser). Il donne au minimum l'assurance d'un déroulement correct de la manipulation. Pour chaque série d'analyses, on peut utiliser soit un échantillon de référence naturellement contaminé, soit un échantillon artificiellement contaminé par dopage avec une souche NPB de référence.
- un **témoin négatif de PCR** (A- ou Teau) : il contient tous les éléments du mélange réactionnel mais aucun extrait d'ADN n'est ajouté, uniquement de l'eau ; cela permet de vérifier l'absence de contamination au cours de la réaction de PCR.
- Un **témoin positif de PCR (A+) pour chaque cible du couple d'amorces** en limite de détection (il s'agit d'un témoin de PCR contenant la séquence d'ADN cible en quantité proche du seuil de détection). Ce témoin n'est pas obligatoire mais est conseillé en complément du témoin positif de processus à concentration bactérienne élevée. Son usage permettra de détecter de petites anomalies de déroulement du test, susceptibles d'entraîner la non-détection d'échantillons faiblement infectés. Ce témoin est choisi par le laboratoire parmi les échantillons ayant fourni, lors d'études préalables, des résultats suffisamment constants. Il peut s'agir de témoins positifs produits en interne (suspension bactérienne de référence à une concentration déterminée, solution d'ADN cible à une concentration déterminée) ou de témoins commerciaux utilisés à une dilution appropriée, lorsqu'ils existent et sont disponibles. Les souches recommandées comme témoin positif de PCR (A+) sont identiques à celles proposées comme témoin positif de processus (T+).

Les témoins de processus doivent faire l'objet de deux puits PCR. Les témoins de PCR peuvent faire l'objet d'un puits unique.

D'autres contrôles peuvent être ajoutés si nécessaire et sont définis par la méthode MOA 022.

D'autres souches ou ADN issus de collections internationales ou isolés par le laboratoire, préalablement vérifiés en test moléculaire peuvent également être utilisés comme témoins de référence.

La manipulation de ces témoins positifs doit s'effectuer de manière séparée dans l'espace et/ou dans le temps de façon à éviter toute contamination accidentelle des échantillons.

5.6.2 Test d'isolement clé sur milieu gélosé

Il est conseillé d'utiliser *a minima* comme témoins de processus pour l'isolement un témoin positif de processus utilisé pour les tests PCR (souche de référence de l'écotype Moko ou NPB ; voir §5.6.1) et un témoin négatif de processus (TS). Ces témoins doivent être manipulés dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser.



5.6.3 Test d'identification par PCR conventionnelle (duplex 93F/R & 5F/R et simplex Oli1/Y2) sur souches isolées appartenant au complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum*

Conformément aux exigences de la méthode d'analyse MOA 022, les témoins à intégrer dans le test de PCR conventionnelle pour l'identification sur souches isolées sont les suivants :

- un **témoin négatif de processus** (TS) : suspension ne contenant pas l'organisme cible (donc constituée uniquement de l'eau de qualité analytique stérilisée), traitée dans les mêmes conditions que les suspensions bactériennes à analyser, déclarée non contaminée à l'issue de la manipulation.
- un **témoin positif de processus** (T+) : suspensions bactériennes réalisées à partir d'une souche NPB de référence, traitée dans les mêmes conditions que les suspensions bactériennes à analyser, déclarée contaminée à l'issue de la manipulation. Ce témoin donne au minimum l'assurance d'un déroulement correct de la manipulation.
- un **témoin négatif de PCR** (A- ou Teau) : il contient tous les éléments du mélange réactionnel mais aucune souche ou extrait d'ADN n'est ajouté, uniquement de l'eau ; cela permet de vérifier l'absence de contamination au cours de la réaction de PCR.

Les témoins de processus doivent faire l'objet de deux puits PCR. Les témoins de PCR peuvent faire l'objet d'un puits unique.

D'autres contrôles peuvent être ajoutés si nécessaire et sont définis par la méthode MOA 022.

D'autres souches ou ADN issus de collections internationales ou isolés par le laboratoire, préalablement vérifiés en test moléculaire peuvent également être utilisés comme témoins de référence.

La manipulation de ces témoins positifs doit s'effectuer de manière séparée dans l'espace et/ou dans le temps de façon à éviter toute contamination accidentelle des échantillons.

6. Appareillage et matériels

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient 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 méthode officielle d'analyse MOA 022. Différents systèmes peuvent être utilisés, en fonction de l'appareillage disponible au laboratoire.

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 < 10 mL : EMT = $\pm 10\%$ Volume ≥ 10 mL : EMT = $\pm 5\%$
Masse	EMT = $\pm 10\%$
pH	EMT = $\pm 0,3$ 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 : $\leq -65^{\circ}\text{C}$ Thermocycleur* : EMT justesse = $\pm 1^{\circ}\text{C}$; EMT homogénéité = $\pm 2^{\circ}\text{C}$
Longueur	EMT = $\pm 10\%$
Temps	EMT = $\pm 10\%$

*Un test biologique (mis en œuvre selon les préconisations de la MOA022) peut venir compléter ou se substituer à la vérification métrologique des thermocycleurs.

6.1 Broyeur

Cette méthode a été validée en utilisant un broyeur à billes (de type « Homex© » modèle 6 de Bioreba) avec broyage de l'échantillon dans un sachet de broyage en plastique, muni d'une gaze de filtration à mailles en nylon (de type Bioreba « Universal » 12 x 15 cm). Le broyat végétal peut alors être récupéré directement dans le sachet. Tout autre système de broyage peut être utilisé, pourvu qu'il permette d'obtenir une qualité de broyage équivalente et limite les risques de contaminations croisées.

6.2 Thermocycleur pour PCR point final

Le protocole a été évalué sur thermocycleur Veriti™ Thermal Cycler de Applied Biosystems et sur GeneAmp® PCR System9700 de Applied Biosystems. D'autres thermocycleurs permettant d'obtenir des résultats équivalents peuvent être utilisés.

6.3 Unité de filtration

Cette méthode a été validée en utilisant une unité de filtration par le vide : le modèle est de marque Nalgene de 250 mL en montage membrane millipore 0.22 μm de 47 mm de diamètre.

7. Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Pour les analyses sur plante, le laboratoire réalise l'analyse à partir d'une prise d'essai de 2 g de matériel végétal frais (pseudotrunc) ; en dessous de cette quantité de matériel végétal frais, des réserves sont émises quant au résultat d'analyse si ce dernier est négatif. Les pseudotrons pour analyse doivent arriver au laboratoire dans un état de fraîcheur approprié (turgescents).

Dans le cas contraire, le laboratoire émet des réserves sur tout résultat d'analyse négatif en précisant l'état inapproprié de l'échantillon à la réception au laboratoire. Si les échantillons arrivent



dans un état trop 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.

Pour les analyses sur l'eau, le laboratoire réalise l'analyse sur un volume d'eau de 1 L ; en dessous de cette quantité, des réserves sont émises quant au résultat d'analyse si ce dernier est négatif.

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.

Le délai entre la réception de l'échantillon et le début de l'analyse doit être de préférence inférieur à 3 jours pour les échantillons d'eau et végétaux ; et ne doit pas dépasser 7 jours pour les échantillons de matériel végétal frais prélevés dans de bonnes conditions et pour l'eau. L'échantillon devra pendant ce temps être conservé à +5°C.



7.3 Conservation des échantillons ou reliquats 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 autre que négatif, 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.

Étapes	Type de reliquat	Conservation		Modalités d'envoi à un autre laboratoire le cas échéant
		Conditions	Durée	
Prise d'essai Plante	Tiges de bananier ou exsudat bactérien	+5°C	Tout résultat : 15 jours après envoi du rapport	Sachets ou tubes individuels fermés et clairement identifiés Température ambiante Transporteur express avec suivi
Prise d'essai Eau	Volume d'eau	+5°C	Tout résultat : 15 jours après envoi du rapport	tubes ou bouteilles individuels fermés et clairement identifiés Température ambiante Transporteur express avec suivi
Isolements bactériens	Boîtes d'isolement / isolat repiqué	+5°C	Tout résultat : 15 jours après envoi du rapport	Boîtes de culture parafilmées en conditionnement hermétiques et clairement identifiées Température ambiante Transporteur express avec suivi
Identification PCR	Souches bactériennes identifiées positivement, mises en collection	Selon les modalités de mise en collection (exemple : température ambiante pour les lyophilisats ; température $\leq -18^{\circ}\text{C}$ pour les cryobilles ou les suspensions bactériennes)	Résultat positif : 12 mois	Conditionnements hermétiques clairement identifiés Température ambiante Transporteur express avec suivi



8. Mode opératoire

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

Deux possibilités se présentent pour la préparation des échantillons.

Pour le prélèvement sur eau :

Un volume d'un litre est nécessaire pour la filtration. Si l'eau est jugée turbide, et que le débit sur le filtre est trop lent, une dilution au 1/10^e est nécessaire pour le bon déroulement de l'expérimentation. Un volume final de 1 L sera donc analysé, même dilué au 1/10^e.

Pour le prélèvement sur plante :

Chaque extrémité de l'échantillon sera rafraîchie par une coupe transversale, permettant d'éliminer les parties sèches. Si la présence de souillure (terre...) est constatée sur le pseudotrunc, une désinfection rapide à l'alcool est nécessaire. Les premières feuilles enroulées seront ensuite enlevées afin d'éviter les contaminations externes de l'échantillon. Enfin, la prise d'essai des échantillons se calibre sur la masse de 2,0 g de matériel végétal frais, excisé à l'aide d'un scalpel.

Notes générales :

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 et d'eau sont conservés selon les modalités indiquées dans le tableau au §7.3.

8.2 Filtration de l'échantillon de type eau sur membranes

Dans le cadre d'une demande d'analyse à réaliser pour l'isolement de souches du complexe d'espèces *R. solanacearum* dans l'eau, un appareil de filtration par le vide est nécessaire : le modèle validé de filtration est de marque Nalgene de 250 mL. La filtration est effectuée par le vide sur membrane millipore de 47 mm de diamètre pour des pores de 0.22 µm (maximum 0.45 µm). Un total de 250 mL d'eau est filtré par membrane, pour 1 L d'échantillon testé, 4 membranes sont donc nécessaires. Dans le cas d'une eau turbide, une dilution au 1/10^e doit être réalisée afin de ne pas saturer la membrane en impureté. Les 4 membranes sont collectées dans un volume final de 5 mL de TRIS (annexe 1). Un repos de 15 min suivi d'une agitation par vortex de 1 min sont nécessaires pour suspendre les cellules bactériennes. A l'issue de cette étape, transférer 1,5 mL de suspension dans un tube de type Eppendorf de 2 mL afin de réaliser les étapes de détection ultérieures. Aucune extraction d'acides nucléiques n'est nécessaire préalablement à la PCR.

8.3 Broyage de l'échantillon végétal

Les prises d'essai sont placées dans des sachets de broyage adaptés au type de broyeur (ex HOMEX 6). Ajouter 5 mL de tampon TRIS (recette annexe 1) stérile et broyer afin de libérer et suspendre les potentielles cellules cibles du complexe d'espèces *R. solanacearum*. Néanmoins, le broyage peut se faire à l'aide d'un pilon autoclavé ou nettoyé et flambé à l'éthanol 70° ou 90°. Le matériel végétal peut également être dilacéré en fines particules à l'aide d'une lame de scalpel stérile. Un temps d'attente de 10 min après broyage est nécessaire pour un rendement optimal de cellules cibles du complexe d'espèces *R. solanacearum*. A l'issue de cette étape, transférer 1,5 mL



de suspension dans un tube de type Eppendorf de 2 mL afin de réaliser les étapes de détection ultérieures. Aucune extraction d'acides nucléiques n'est nécessaire préalablement à la PCR.

Remarque : dans le cas d'un traitement différé de l'échantillon en solution, il est fortement recommandé de le conserver à une température ambiante (environ 25°C) pendant moins de 2h ; dans le cas contraire, une exposition prolongée au froid ou à des températures trop basses entraînerait une probable impossibilité de culture des souches cibles du complexe d'espèces *R. solanacearum* sur milieux microbiologiques gélosés.

8.4 Test spécifique de détection par duplex PCR conventionnelle 93F/R & 5F/R sur broyat végétal ou filtrât d'eau

Cette première étape de duplex PCR conventionnelle 93F/R & 5F/R fournira des résultats permettant de compléter l'interprétation de l'étape d'isolement sur milieux microbiologiques gélosés. En effet, des contaminants peuvent apparaître dès les premières 24h dans l'étape d'isolement et nuire à la bonne interprétation des résultats.

8.4.2 Mélange réactionnel

Réactifs	[Solution Mère] exemple	[Puits]	Volume pour un puits (μ L) (pour les concentrations de solutions-mères données)
Eau			13.88
Buffer	5 x	1 x	5
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM	1.5
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.5
Amorce 93F	100 μ M	2 μ M	0.5
Amorce 93R	100 μ M	2 μ M	0.5
Amorce 5F	100 μ M	2 μ M	0.5
Amorce 5R	100 μ M	2 μ M	0.5
GoTaq® G2 Hot Start Polymerase (Promega)	5 U/ μ L	0.625 U/ μ L	0.125
Broyat végétal ou filtrât d'eau			2
Total			25

[Ci] : Concentration des solutions mères ; [Cf] : concentration finale dans le mix réactionnel ;
[Puits] : volume final en μ L dans chaque puits PCR réactionnel.

Remarques :

- Le volume final est de 25 μ L dans chaque puits soit 23 μ L de mélange réactionnel et 2 μ L de suspension bactérienne (ou d'ADN dans le cadre de témoins positifs PCR ; ou d'eau dans le cadre du témoin négatif de PCR) ;
- Établir soigneusement le plan de plaque et d'identification des extraits. Chaque échantillon est déposé deux fois soit deux puits par échantillon (analyse de détection).



8.4.2 Dépôt des mélanges réactionnels

Déposer deux puits PCR par prise d'essai pour les échantillons et selon les différents témoins.

8.4.3 Cycles thermiques PCR

Étapes	Température (°C)	Durée	Cycles
Dénaturation initiale	96	5 min	
Dénaturation	94	15 s	35
Hybridation	70	30 s	
Elongation	72	30 s	
Elongation finale	72	10 min	
Conservation	12	∞	

8.5 Test d'isolement clé sur milieu gélosé

Une fraction de 50 µL de l'échantillon fraîchement broyé ou filtré (en fonction de la nature de la matrice de l'échantillon) est étalée selon la méthode par épuisement en « trois secteurs » sur milieux microbiologiques gélosés (Annexe 1) de Kelman et de Sequeira modifié, contenant 1 g/L d'extraits de levure. Le milieu Sequeira peut être substitué par le milieu SMSA de Englebrecht (1994) modifié par Elphinstone et al. (1996), mais devra aussi contenir 1 g/L d'extraits de levure, sous peine de voir certaines souches de l'écotype Moko subir de fortes inhibitions de croissance. Un total de deux répétitions est nécessaire par milieu microbiologique gélosé (Kelman et Sequeira ou SMSA) pour assurer un isolement robuste sur milieux microbiologiques gélosés, soit 4 boîtes de pétri en tout par échantillon.

Dans le cadre d'échantillon d'eau filtrée sur membranes, des dilutions sont nécessaires afin d'isoler les colonies et de les discriminer par rapport aux contaminants. Ainsi, un étalement de la solution mère, et de deux dilutions filles à 10^{-1} et 10^{-2} est nécessaire, respectivement en duplicat, soit 4 étalements par dilution pour un total de 12 étalements par échantillon.

L'incubation des milieux microbiologiques gélosés se fait à 28°C pendant 2 à 6 jours. Le temps indiqué ici est variable, car les souches cibles du complexe d'espèces *R. solanacearum* de l'écotype Moko présentent une croissance lente. Le milieu de Sequeira ou SMSA ne permettant pas une croissance optimale des souches Moko, une utilisation en parallèle du milieu de Kelman est obligatoire. Seuls des contaminants peuvent pousser en moins de 30h d'incubation.

Tout échantillon présentant au moins une colonie typique ou suspecte du complexe d'espèces *R. solanacearum* sur au moins une boîte de culture doit faire l'objet d'une identification. Le repiquage se fera sur une autre boîte de culture de Kelman en suspendant la colonie dans un volume approprié d'eau stérile ou de tampon TRIS (voir annexe 1) et en l'étalant en « trois secteurs », puis en l'incubant selon les mêmes modalités décrites précédemment, afin de purifier une nouvelle fois la colonie.

- Pour une anse de 1 µL (1,45 mm) utilisée pour prélever une colonie, un volume de 200 µL sera nécessaire pour sa suspension.
- Pour une anse de 10 µL (4,00 mm) utilisée pour prélever une colonie, un volume de 500 µL sera nécessaire pour sa suspension.



Remarque : pour les repiquages de colonies, il est important de prélever les colonies repiquées depuis 24h dans le cas d'une croissance normale et de considérer au moins 48h pour des colonies à croissance lente. Les anses de prélèvement ne doivent pas être surchargées en colonies (non bombée) pour permettre une bonne amplification moléculaire PCR.

Les suspensions sont vortexées afin d'éliminer les agglomérats bactériens et de produire une suspension homogène et trouble. Elles sont stockées à une température $\leq -18^{\circ}\text{C}$, pour une utilisation différée ou un stockage longue durée.

8.6 Test général d'identification par simplex PCR (Oli1/Y2) des souches isolées appartenant au complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum*

8.6.1 Préparation du mélange réactionnel

Réactifs	[Solution Mère] exemple	[Puits]	Volume pour un puits (μL) (pour les concentrations de solutions-mères données)
Eau			10.875
Buffer	5 x	1 x	5
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM	1.5
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.5
Amorce Oli1	10 μM	1 μM	2.5
Amorce Y2	10 μM	1 μM	2.5
GoTaq® G2 Hot Start Polymerase (Promega)	5 U/ μL	0.625 U/ μL	0.125
Suspension bactérienne			2
Total			25

[Ci] : Concentration des solutions mères ; [Cf] : concentration finale dans le mix réactionnel ;
[Puits] : volume final en μL dans chaque puits PCR réactionnel.

Remarque :

Se reporter aux remarques du §8.4.1

8.6.2 Dépôt des mélanges réactionnels

Déposer deux puits PCR par prise d'essai pour les échantillons et selon les différents témoins.



8.6.3 Cycles thermiques PCR

Étapes	Température (°C)	Durée	Cycles
Dénaturation initiale	96	2min	
Dénaturation	94	20s	35
Hybridation	68	20s	
Élongation	72	30s	
Élongation finale	72	10min	
Conservation	12	∞	

8.7 Test spécifique d'identification sur souches isolées par duplex PCR conventionnelle 93F/R & 5F/R appartenant à l'écotype Moko ou NPB du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum*

8.7.1 Mélange réactionnel

Réactifs	[Solution Mère] exemple	[Puits]	Volume pour un puits (µl) (pour les concentrations de solutions-mères données)
Eau			13.875
Buffer	5 x	1 x	5
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM	1.5
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.5
Amorce 93F	100 µM	2 µM	0.5
Amorce 93R	100 µM	2 µM	0.5
Amorce 5F	100 µM	2 µM	0.5
Amorce 5R	100 µM	2 µM	0.5
GoTaq® G2 Hot Start Polymerase (Promega)	5 U/µL	0.625 U/µL	0.125
Suspension bactérienne			2
Total			25

[Ci] : Concentration des solutions mères ; [Cf] : concentration finale dans le mix réactionnel ;
[Puits] : volume final en µL dans chaque puits PCR réactionnel.

Remarque :

Se reporter aux remarques du §8.4.1

8.7.2 Dépôt des mélanges réactionnels

Déposer les mélanges réactionnels dans deux puits PCR par prise d'essai pour les échantillons et selon les différents témoins.



8.7.3 Cycles thermiques PCR

Étapes	Température (°C)	Durée	Cycles
Dénaturation initiale	96	5 min	
Dénaturation	94	15 s	35
Hybridation	70	30 s	
Elongation	72	30 s	
Elongation finale	72	10 min	
Conservation	12	∞	

8.8 Électrophorèse et révélation

Pour chaque amplification, 10 µL de produit de PCR sont déposés sur un gel d'agarose à 1,5% (valeurs indicatives) et visualisé après migration. L'électrophorèse et la révélation sont réalisées conformément à la MOA 022.

9. Résultats

9.1 Contrôle de la validité des résultats

La vérification de la conformité à l'attendu pour les témoins est un préalable à l'interprétation des résultats des échantillons soumis à analyse. Les résultats attendus pour les témoins utilisés dans chaque test sont décrits dans les paragraphes ci-après.

9.1.1 Test spécifique de détection sur broyat végétal ou filtrât d'eau par duplex PCR conventionnelle 93F/R & 5F/R

L'analyse par PCR conventionnelle est validée si les conditions ci-dessous sont vérifiées :

Type de contrôle	Résultats attendus		
	Puits 1	Puits 2	Final
Témoin négatif de processus (TS)	-	-	NÉGATIF
Témoins positifs de processus (T+) Moko et NPB	+	+	POSITIF
Témoins positifs d'amplification (A+) ¹ pour Moko et NPB	+	+	POSITIF
Témoin négatif d'amplification (A- ou Teau)	-	- ²	NÉGATIF

¹ Ce témoin est facultatif ; ² la duplication de ce témoin est facultative.



9.1.2 Test d'isolement clé sur milieu gélosé

Pour valider les résultats d'isolement issus des échantillons, il faut préalablement s'assurer de :

- L'absence de colonies typiques du complexe d'espèces *R. solanacearum* sur les boîtes d'isolement du témoin négatif de processus ;
- La présence de colonies typiques du complexe d'espèces *R. solanacearum* sur les boîtes d'isolement du témoin positif de processus.

9.1.3 Test spécifique d'identification par duplex PCR conventionnelle 93F/R & 5F/R et test général d'identification par simplex PCR (Oli1/Y2) sur souches isolées du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum*

L'analyse par PCR conventionnelle sur souches isolées est validée dans les mêmes conditions que pour la détection *in planta* par PCR conventionnelle.

Type de contrôle	Résultats attendus		
	Puits 1	Puits 2	Final
Témoin négatif de processus (TS)	-	-	NÉGATIF
Témoins positifs de processus (T+) Moko et NPB	+	+	POSITIF
Témoins positifs d'amplification (A+) ¹ pour Moko et NPB	+	+	POSITIF
Témoin négatif d'amplification (A- ou Teau)	-	- ²	NÉGATIF

¹ Ce témoin est facultatif ; ² la duplication de ce témoin est facultative.

9.2 Calculs et expression des résultats

9.2.1 Test spécifique de détection sur broyat végétal ou filtrât d'eau par duplex PCR conventionnelle 93F/R & 5F/R

Le résultat d'un puits PCR est positif s'il présente une bande à la taille attendue.

Le résultat d'un puits PCR est négatif s'il ne présente aucune bande à la taille attendue.

Les résultats s'interprètent de la manière suivante :

Analyses		Résultat	Interprétation
Puits 1	Puits 2		
+	+	POSITIF	Test positif
+	-	PCR à refaire <i>si à nouveau au moins 1 positif sur 2, le test est interprété comme positif</i>	
-	-	NÉGATIF	Test négatif

9.2.2 Test d'isolement clé sur milieu gélosé

L'aspect des colonies sur milieu gélosé, aspect fluide et muqueux, a été rapidement corrélé avec un pouvoir pathogène actif. La coloration est uniforme blanc-crème pouvant prendre une coloration



rouge-rosé et elliptique au centre, surtout lorsque la colonie a atteint une maturité de croissance. A *contrario*, les colonies possédant un aspect rugueux et sec présentent souvent un phénotype non virulent. Les souches peuvent présenter une croissance de larges colonies muqueuses ou de petites colonies, sous l'aspect d'une tête d'épingle peu muqueuse (c'est notamment le cas des souches Moko).



Colonies typiques du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* sur milieu microbiologique gélosé de Sequeira

9.2.3 Analyse et interprétation des résultats du test d'isolement clé sur milieu gélosé et de la détection sur broyat végétal ou filtrât d'eau par duplex-PCR 93F/93R & 5F/5R

		Test d'isolement clé sur milieu gélosé	
		+	-
Test spécifique de détection sur broyat végétal ou filtrât d'eau par duplex-PCR 93F/93R & 5F/5R	+	Suspicion de présence de souches Moko ou variantes IIB-4NPB (1)	Présence suspectée de souches Moko ou variantes NPB dans l'échantillon xx par méthode PCR conventionnelle. Le cas échéant : l'échantillon a été transmis au laboratoire xx pour confirmation.
	-		Souche du complexe d'espèces <i>R. solanacearum</i> <u>non détectée</u> dans l'échantillon xx par méthode d'isolement sur milieu sélectif et par PCR conventionnelle

(1) Les analyses ne permettent pas de statuer : la présence de souches Moko ou variantes IIB-4NPB est suspectée ; poursuivre le schéma de détection.



- Dans le cas où l'isolement de souches du complexe d'espèces *R. solanacearum* est positif sur milieu semi-sélectif, la poursuite du protocole est obligatoire.
- Dans le cas où l'isolement de souches du complexe d'espèces *R. solanacearum* est négatif sur milieu semi-sélectif, mais que la duplex-PCR conventionnelle 93F/R & 5F/R est positive, on interprètera de la façon suivante : « Suspicion de présence de souches Moko ou variantes NPB dans l'échantillon xx par méthode PCR conventionnelle. ». L'échantillon sera soumis pour confirmation.
- Dans le cas où l'isolement de souches du complexe d'espèces *R. solanacearum* est négatif sur milieu semi-sélectif, et que la duplex-PCR PCR conventionnelle 93F/R & 5F/R est négative, on interprètera de la façon suivante : « Souche du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* non détectée dans l'échantillon xx par méthode d'isolement sur milieu sélectif et par PCR conventionnelle. ».

9.2.4 Test général d'identification par simplex PCR (Oli1/Y2) des souches isolées appartenant au complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum*

		Test général d'identification par PCR Oli1/Y2	
		+	-
Test spécifique de détection sur broyat végétal ou filtrât d'eau par duplex-PCR 93F/93R & 5F/5R	+ 447 pb (Moko) ou 447 pb et 661 pb (II4NPB)	Souche du complexe d'espèces <i>Ralstonia solanacearum</i> <u>détectée</u> dans l'échantillon xx par méthode PCR conventionnelle Oli1/Y2	<u>Présence suspectée</u> de souches Moko ou variantes NPB dans l'échantillon xx par méthode PCR conventionnelle. Le cas échéant : l'échantillon a été transmis au laboratoire xx pour confirmation.
	-	(1)	Souche du complexe d'espèces <i>Ralstonia solanacearum</i> <u>non détectée</u> dans l'échantillon xx par méthode d'isolement sur milieu sélectif et par PCR conventionnelle Oli1/Y2

(1) Les analyses permettent de décrire la présence de souches du complexe d'espèces *R. solanacearum* dans l'échantillon ; poursuivre le schéma de détection



9.2.5 Formulation des résultats de biologie moléculaire 93F/93R & 5F/5R sur souche pure

La formulation des résultats sur le rapport d'analyse doit se faire de la façon suivante :

Test PCR sur souche pure			
Couples d'amorces	93F/93R & 5F/5R		
Résultat	NÉGATIF	POSITIF	POSITIF
Taille de bande d'amplification PCR	Pas d'amplification à 477 pb	477 pb uniquement	477 pb & 661 pb
Interprétation	<i>Souche Moko ou variante IIB-4NPB <u>non détectée</u> dans l'échantillon xx par méthode PCR conventionnelle, mais contamination par autre souche du complexe d'espèces <i>R. solanacearum</i></i>	<i>Souche Moko du complexe d'espèces <i>R. solanacearum</i> <u>détectée</u> dans l'échantillon xx par méthode PCR conventionnelle</i>	<i>Souche variante IIB-4NPB du complexe d'espèces <i>R. solanacearum</i> <u>détectée</u> dans l'échantillon xx par méthode PCR conventionnelle</i>

9.3 Analyses de confirmation

Une analyse de confirmation doit être réalisée :

- Systématiquement pour les échantillons montrant une amplification PCR positive à l'aide des amorces en duplex 93F/93R & 5F/5R, mais que l'isolement est négatif ;
- Systématiquement pour les échantillons montrant une bande d'amplification PCR de 477pb et/ou de 661pb à l'aide des amorces en duplex 93F/93R & 5F/5R, mais pas d'amplification de 288 pb à l'aide des amorces OLI1/Y2 ;
- Au cas par cas pour les échantillons montrant une amplification insuffisante ou non répétable, afin de statuer clairement sur le caractère positif ou négatif de l'échantillon.

Cette confirmation se fait à partir de la suspension bactérienne ou, à défaut, des reliquats d'échantillons primaires (pseudo-tronc ; eau) ou si l'état de conservation de ces échantillons le permet ; sinon elle se fait à partir de nouveaux prélèvements. Les reliquats d'analyse pertinents (pseudo-tronc surnuméraires conservées à +5°C, eau et suspensions bactériennes conservés à une température $\leq -18^{\circ}\text{C}$) doivent également être fournis au laboratoire réalisant l'analyse de confirmation.



10. Caractéristiques de performance de la méthode

Caractéristique	Paramètre	Valeur obtenue à l'issue de la caractérisation	Modalités de caractérisation
Sensibilité	Pourcentage d'échantillons détectés parmi les échantillons cibles	92% pour 93F/R 100% pour 5F/R	41 échantillons cibles testés en duplicat représentatifs de la diversité géographique, génétique et de plantes hôtes
Spécificité	Pourcentage d'échantillons non détectés parmi les échantillons non-cibles	100% pour 93F/R 100% pour 5F/R	66 échantillons non-cibles testés en duplicat représentatifs de la diversité géographique, génétique et de plantes hôtes
Exactitude	Pourcentage de vrais positifs et de vrais négatifs parmi des échantillons cibles et des échantillons non-cibles	96% pour 93F/R 100% pour 5F/R	41 échantillons cibles et 66 échantillons non-cibles testés en duplicat
Seuil de détection	Niveau de concentration le plus bas pour lequel tous les résultats (100%) sont positifs	10^5 CFU/mL	15 échantillons cibles testés en duplicat sur 6 niveaux de concentration : 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 CFU/mL
Répétabilité	Pourcentage d'accords entre répliquats d'un même échantillon	100%	5 échantillons testés en triplicat



Annexe 1 - Recette des milieux microbiologiques et tampons utilisés pour la détection des souches Moko et NPB du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum*

Milieu Kelman (pour 1 L) – pH = 7,20

Kelman (pH 7.20)	
Extraits de levure	1 g
Bacto-Peptone	11 g
Glycérol	6,3 g
Agar	18,0 g
Après Autoclavage et refroidissement à 47°C, ajouter :	
Chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium	25 mg

N'utilisez le milieu gélosé de Kelman qu'à température ambiante et le conserver à une température < 20°C à l'abri de la lumière pour une durée maximale de 2 mois.

Milieu Sequeira modifié (pour 1 L)

Sequeira modifié (pH 7,20)	
Extraits de Levure	1 g
Bacto-Peptone	11 g
Glycérol	6,3 g
Agar	18,0 g
Après Autoclavage et refroidissement à 47°C, ajouter :	
Chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium	25 mg
Crystal Violet	2 mg
Chloramphénicol	5 mg
Pénicilline G	20 U
Sulfate de polymixine-B	10 mg
Tyrosine	20 mg

N'utilisez le milieu gélosé de Sequeira modifié qu'à température ambiante et le conserver à une température < 20°C à l'abri de la lumière pour une durée maximale de 3 mois.



Milieu SMSA (pour 1 L)

SMSA (pH 7,20)	
Extraits de Levure	1 g
Bacto-Peptone	11 g
Glycérol	6,3 g
Agar	18,0 g
Après Autoclavage et refroidissement à 47°C, ajouter :	
Chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium	50 mg
Crystal Violet	5 mg
Chloramphénicol	5 mg
Pénicilline G	825 U
Sulfate de polymixine-B	100 mg
Bacitracine	25 mg
Pour une inhibition supplémentaire des champignons ou d'autres flores telluriques, ajouter :	
Cycloheximide	100 mg

N'utilisez le milieu gélosé de SMSA qu'à température ambiante et le conserver à une température < 20°C à l'abri de la lumière pour une durée maximale de 3 mois.

Composition du tampon de broyage TRIS Sigma 7-9 10 mM (pH = 7.2)

La composition du tampon de broyage TRIS Sigma 7-9 pour 1L est la suivante :

Composants	Masse Molaire (g/mol)	Concentration finale	Poids (g)
Tris(hydroxyméthyl)aminométhane NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃ [Sigma 7-9]	121,135	10 mM	1,211
		Eau distillée	Qsp 1 L

Étapes de fabrication :

- Peser le TRIS Sigma 7-9 et le mettre en solution dans une le volume final d'eau distillée ;
- Contrôler le pH et ajuster si nécessaire à 7,2 ;
- Autoclaver le tampon ;

Consignes d'utilisation :

N'utilisez le tampon de broyage qu'à température ambiante et le conserver à +5°C pour une durée maximale de 3 mois.



Bibliographie

2000. Council Directive 2000/29/EC concerning protective measures against the introduction into the Community of organisms harmful to plants or plant products and against their spread within the Community, p. 112. *In* E. Communities (ed.), Official Journal L169, vol. Council Directive 2000/29/EC.

2006. Council Directive 2006/63/EC amending Annexes II to VII to Council Directive 98/57/EC on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., p. 71. *In* E. Communities (ed.), Official Journal L206/36, vol. Council Directive 2006/63/EC.

Cellier, G., B. Remenant, F. Chiroleu, P. Lefeuvre, and P. Prior. 2012. Phylogeny and population structure of brown rot and Moko disease-causing strains of *Ralstonia solanacearum* phylotype II. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**:2367-2375.

Elphinstone, J. G., J. K. Hennessy, J. K. Wilson, and D. E. Stead. 1996. Sensitivity of different methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. *EPPO Bulletin* **26**:663-678.

Englebrecht, M. C. 1994. Modification of a selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. *ACIAR Bacterial Wilt Newsletter* **10**:3-5.

Fegan, M., and P. Prior. 2005. How complex is the "*Ralstonia solanacearum* species complex", p. 449-461. *In* C. Allen, P. Prior, and A. C. Hayward (ed.), *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum* species complex. APS Press, St Paul, MN.

Fegan, M., and P. Prior. 2006. Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species complex cause bacterial wilts of banana. *Australas. Plant Pathol.* **35**:93-101.

Hayward, A. C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **29**:65-87.

Seal, S. E., L. A. Jackson, J. P. Young, and M. J. Daniels. 1993. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and the Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *J. Gen. Microbiol.* **139**:1587-1594.

Sequeira, L. 1998. Bacterial wilt: the missing element in international banana improvement programs, p. 6-14. *In* P. Prior, C. Allen, and J. Elphinstone (ed.), *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects*. INRA Editions, Paris, France.

Swanson, J. K., J. Yao, J. Tans-Kersten, and C. Allen. 2005. Behavior of *Ralstonia solanacearum* Race 3 biovar 2 during latent and active infection of geranium. *Phytopathology* **95**:136-143.

Wicker, E., L. Grassart, R. Coranson-Beaudu, D. Mian, C. Guilbaud, M. Fegan, and P. Prior. 2007. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:6790-6801.