

## Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA 028 - Version 3

Septembre 2019

# Détection de *Xanthomonas phaseoli* pv. *dieffenbachiae* (Xpd) sur *Anthurium* spp. par nested-PCR et par isolement suivi d'une identification par PCR des souches isolées

Laboratoire de la santé des végétaux

Laboratoire national de référence pour la détection des bactéries sur plantes tropicales



## Historique de la méthode

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

*Une modification est considérée comme majeure* dès lors qu'elle concerne des parties clés ou le fond même de la méthode, dont la prise en compte est susceptible d'améliorer significativement la portée ou le résultat de la méthode d'analyse. Une modification majeure induit en général des adaptations importantes. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation.

*Une modification est considérée comme mineure* si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Les caractéristiques de performance de la méthode ainsi améliorée ne sont pas modifiées; elle n'a pas fait l'objet d'une nouvelle validation.

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

**Tableau 1** : Historique des versions de la présente méthode

Version	Nature des modifications	Date	Principales modifications
Version 1a *	Sans objet	Mars 2013	Version initiale
Version 1b	Mineure	Novembre 2013	Des précisions ont été apportées : - à la partie C « Description de la PCR appliquée sur souches isolées » : -§4.1 : ébullition pendant au moins une minute (au lieu de « approximativement » une minute). -§4.2 : est précisée la possibilité d'utiliser la nested-PCR en identification dans les conditions de la détection à condition de prendre toutes les précautions nécessaires pour éviter les contaminations. -à l'annexe 1 « recette du milieu LPGA utilisé pour la détection de Xad », il est précisé la possibilité d'ajouter un antibiotique et/ou un antifongique à la recette de base.
Version 1c	Mineure	Juin 2014	-Des précisions ont été apportées à la partie A « Description de la Nested-PCR » : §4.4 : il est ajouté la possibilité d'utiliser le mélange réactionnel du kit Gotaq® G2 Hot Start Polymerase de Promega (en remplacement du kit Gotaq® Hot Start Polymerase de Promega) à la fois pour l'étape de PCR primaire (§4.4.1) et pour l'étape de PCR nested (§4.4.2). - Avec un impact sur la partie C « Description de la PCR appliquée sur souches isolées », puisque celle-ci fait référence (§4.2) aux indications du §4.4 de la partie A. -Des précisions ont été apportées à la partie B quant aux conditions d'utilisation du milieu NCTM4. -Correction d'une coquille dans la remarque en annexe 1.
Version 2	Mineure	Mars 2017	Mise au format Anses de la MOA 028 parties A, B et C (pas de reprise des parties D et E) – modification du titre en conséquence Pas de modification sur le fond de la méthode. Ajout des §6.2, 7.2, 7.3 et 10. Des modifications apportées : -sur le schéma de la méthode (§4) en reprenant uniquement ce qui relève de la présente méthode (suppression de la référence aux méthodes de confirmation). -dans le §5.2 en ajoutant la validation positive du kit Qualiplante -dans le §8.5 en rendant facultative l'étape de lyse thermique.



Version 3**	Mineure	Septembre 2019	-Changement de nomenclature de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>dieffenbachiae</i> remplacé par <i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>dieffenbachiae</i> (tout le texte + §1 Objet et domaine d'application). Corrections éditoriales, notamment au tableau 8 pour l'exemple de calcul sur le volume de MgCl <sub>2</sub> pour un puits (colonne la plus à droite).
-------------	---------	----------------	--

\* Cette méthode a fait l'objet d'une consultation de septembre 2012 à Novembre 2012, notamment auprès des laboratoires agréés français.

\*\* Cette méthode a fait l'objet d'une consultation du 26 juin au 15 août 2019 sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.



## Avant-propos

La méthode décrite dans ce document s'appuie sur le protocole de diagnostic de l'OEPP PM7/23(2) concernant la détection de *Xanthomonas phaseoli* pv. *dieffenbachiae* (Anonymous 2009) et, pour les méthodes de biologie moléculaire (Nested-PCR et PCR sur souches isolées), sur une publication scientifique (Robène-Soustrade et al. 2006). Par ailleurs, la méthode a fait l'objet d'une validation interne et d'une validation interlaboratoire selon les recommandations de la norme ISO 16140 (Anonymous 2003).

La méthode a été caractérisée et validée par l'unité « Ravageurs et pathogènes tropicaux » du Laboratoire de la Santé des Végétaux (LSV-RAPT), Laboratoire National de Référence (LNR) pour la détection des bactéries sur plantes tropicales.

Adresse : Anses - Laboratoire de la santé des végétaux – unité RAPT

3P, 7 chemin de l'IRAT, 97410 Saint-Pierre

Contact : [saint-pierre.lsv@anses.fr](mailto:saint-pierre.lsv@anses.fr)

Le CIRAD Réunion (UMR PVBMT) a étroitement collaboré aux travaux de méthodologie.

Les travaux méthodologiques effectués sur la méthode ont donné lieu à un rapport de validation interne (rapport de validation interne *Xad\_2008*) et à un rapport de validation interlaboratoire (rapport de validation interlaboratoire *Xad* mars 2012). Les résultats de ces travaux ont fait l'objet d'une publication scientifique (Chabirand et al. 2013).



## Sommaire

<b>Avant-propos</b> .....	<b>4</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>7</b>
<b>Avertissements et précautions de sécurité</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Objet et domaine d'application</b> .....	<b>8</b>
<b>2. Documents de référence</b> .....	<b>9</b>
<b>3. Termes, sigles et définitions</b> .....	<b>9</b>
<b>4. Principe de la méthode</b> .....	<b>10</b>
<b>5. Réactifs</b> .....	<b>12</b>
5.1 Eau.....	12
5.2 Réactifs de biologie moléculaire .....	12
5.2.1 Kit d'extraction d'ADN .....	12
5.2.2 Master mix .....	12
5.2.3 Oligonucléotides .....	13
5.3 Tampons .....	13
5.3.1 Composition et préparation .....	13
5.3.2 Conservation.....	13
5.4 Milieux de culture.....	13
5.4.1 Contrôle .....	13
5.4.2 Conservation.....	13
5.5 Autres réactifs et consommables.....	14
5.6 Contrôles et témoins.....	14
5.6.1 Pour la détection in planta par N-PCR.....	14
5.6.2 Pour la détection in planta par isolement.....	15
5.6.3 Pour l'identification par PCR des souches isolées.....	15
<b>6. Appareillage et matériels</b> .....	<b>16</b>
6.1 Broyeur.....	16
6.2 Thermocycleur.....	16
6.3 Appareillage et matériels pour le test d'isolement.....	17
<b>7. Échantillons</b> .....	<b>17</b>
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons .....	17



7.2 Conservation des échantillons avant analyse .....	17
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse.....	17
<b>8. Mode opératoire.....</b>	<b>18</b>
8.1 Préparation des échantillons pour analyse .....	18
8.2 Broyage.....	19
8.3 Détection in planta par N-PCR.....	19
8.3.1 Extraction d'ADN.....	19
8.3.2 PCR Primaire : mélange réactionnel et amplification.....	20
8.3.3 PCR Nested : mélange réactionnel et amplification.....	21
8.3.4 Electrophorèse et révélation.....	21
8.4 Détection in planta par isolement.....	22
8.4.1 Isolement .....	22
8.4.2 Incubation .....	22
8.4.3 Lecture.....	22
8.4.4 Repiquage pour identification.....	22
8.5 Identification par PCR des souches isolées .....	23
8.5.1 Préparation des suspensions bactériennes.....	23
8.5.2 Amplification, électrophorèse et révélation .....	24
<b>9. Résultats .....</b>	<b>24</b>
9.1 Contrôle de la validité des résultats .....	24
9.1.1 Pour la détection in planta par N-PCR.....	24
9.1.2 Pour la détection in planta par isolement.....	25
9.1.3 Pour l'identification par PCR des souches isolées.....	25
9.2 Calculs et expression des résultats .....	25
9.2.1 Pour la détection in planta par N-PCR.....	25
9.2.2 Pour l'identification par PCR des souches isolées.....	26
9.2.3 Pour la méthode globalement .....	26
<b>10. Caractéristiques de performance de la méthode.....</b>	<b>28</b>
<b>Annexe 1 – Recette des milieux utilisés pour la détection de <i>Xpd</i>.....</b>	<b>29</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>30</b>



## Introduction

Le dépérissement bactérien de l'anthurium provoqué par *Xanthomonas phaseoli* pv. *dieffenbachiae* (*Xpd*) est une maladie systémique très sévère présente dans la plupart des aires de culture de l'anthurium.

A la date de publication de la présente méthode, *Xpd* est un organisme nuisible de quarantaine réglementé pour les départements d'outre-mer. En outre le pathogène est inscrit sur la liste A2 de l'OEPP et est donc considéré comme organisme de quarantaine OEPP présent en Europe sans y être largement disséminé.

## Avertissements et précautions de sécurité

Il convient que l'utilisateur de la présente méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité, et de s'assurer de la conformité à la réglementation nationale en vigueur.

Il est essentiel que les manipulations conduites conformément à la présente méthode soient exécutées par du personnel ayant reçu une formation appropriée.

Certains réactifs utilisés dans cette méthode peuvent présenter un risque pour l'utilisateur et/ou l'environnement, l'utilisateur doit impérativement suivre les recommandations du fournisseur pour l'utilisation de ces produits et l'élimination des déchets.

Par ailleurs, l'utilisateur de la présente méthode doit mettre en œuvre toutes les mesures nécessaires pour garantir la non-dissémination de l'organisme nuisible dans l'environnement.

Ainsi, tout fragment de matériel végétal infecté (ou de statut indéterminé/suspicion) et isolement 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 isolements 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/ou avec les isolements bactériens en résultant doit être désinfecté.



## 1. Objet et domaine d'application

### Objet

La précédente version de la méthode ne concernait que les souches de *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* pathogènes de l'*Anthurium*. En effet, il existe une variabilité génétique et pathogénique au sein des bactéries classées comme *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*. Notamment, certaines souches avaient été décrites comme non pathogènes de l'*Anthurium* mais pathogènes sur d'autres aracées (Rademaker et al. 2005).

La nouvelle nomenclature proposée par Constantin et al. (2016) et reprise par Cottyn et al. (2018) dans le Bulletin OEPP est mieux adaptée pour bien identifier les souches pathogènes de l'*Anthurium*.

L'espèce *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* est ainsi désormais divisée en 3 nouvelles espèces :

- les souches *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* pathogènes de l'*Anthurium*, tout comme celles très proches isolées de *Syngonium* initialement classées dans la lignée 9.4 de *X. axonopodis* sensu Rademaker sont désormais classées en *X. phaseoli* (respectivement pv. *dieffenbachiae* et pv. *syngonii*). On notera que les souches *X. phaseoli* pv. *syngonii* bien que proches génétiquement de *Xpd* sont spécialisées et ne causent des dégâts que sur *Syngonium*, elles ne sont pas pathogènes de l'*anthurium*.

- les souches non pathogènes de l'*Anthurium* initialement classées dans la lignée 9.6 de *X. axonopodis* sensu Rademaker sont reclassées en *X. citri* pv. *aracearum*. Il n'existe pas, à notre connaissance (pas de mention dans la littérature ou dans des collections de souches), de *X. citri* pv. *aracearum* naturellement isolées d'*anthurium*, ni aucune publication d'épidémies causées par cette bactérie sur cette espèce végétale.

- des souches isolées de *Philodendron* sont classées en *X. euvesicatoria* (lignée 9.2 de *X. axonopodis* sensu Rademaker). La pathogénicité spécifique sur aroidées des isolats bactériens reclassifiés en tant que *X. euvesicatoria* n'a pas été confirmée et aucune dénomination de pathovar n'a été retenue pour ces souches.

La présente méthode concerne (comme la précédente version) uniquement la détection des souches *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* pathogènes de l'*Anthurium*, autrement dit les souches *Xanthomonas phaseoli* pv. *dieffenbachiae* (sous-groupe Rademaker 9.4) pour reprendre la nomenclature proposée par Constantin et al. (2016).

### Domaine d'application

La méthode s'applique sur feuilles et tiges fraîches d'*anthuriums* symptomatiques ou asymptomatiques.

Les symptômes s'expriment dans un premier temps par l'apparition de petites tâches huileuses sur la face inférieure du limbe foliaire, préférentiellement en bordure des feuilles. Ces tâches (entourées ou non d'un halo chlorotique) évoluent ensuite en lésions nécrotiques sèches. A un stade ultérieur, ces lésions peuvent coalescer en plages nécrotiques irrégulières. Des infections systémiques peuvent apparaître. On observe alors un jaunissement et une chute des feuilles et des fleurs, pouvant conduire à la mort du plant.



**Figure 1** : Différents types de symptômes provoqués par *Xanthomonas phaseoli* pv. *dieffenbachiae* sur *Anthurium* spp. (source Anses LSV)

## 2. Documents de référence

**Tableau 2** : Liste des documents de référence (hors bibliographie).

	Référence	Titre
1	<b>MOA 022</b>	Méthode officielle d'analyse « Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques : PCR (Polymerase Chain Reaction), RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) et PCR temps réel. Détection et identification des organismes phytopathogènes »
2	<b>MOA GLO 001</b>	Glossaire des termes techniques en vigueur au Laboratoire de la santé des végétaux
3	<b>Rapport de validation interne Xad 2008</b>	Évaluation des différentes méthodes de détection et d'identification de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>dieffenbachiae</i> sur anthurium. Rapport de validation interne.
4	<b>Rapport de validation interlaboratoire Xad Mars 2012</b>	Interlaboratory ring test: <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>dieffenbachiae</i> in Anthurium. Report Xad 01-version 2

## 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

La méthode développée dans le document s'appuie sur la combinaison de différents tests.

### Détection et identification de Xpd

Les laboratoires mettant en œuvre la détection de Xpd doivent réaliser simultanément deux tests de détection et (selon le résultat de l'isolement) un test d'identification:

- 1) Détection in planta par nested-PCR conventionnelle (N-PCR) (étape 1) – §8.3
- 2) Détection in planta par isolement (étape 2a) – §8.4
- 3) Identification par PCR des souches isolées (étape 2b) – §8.5

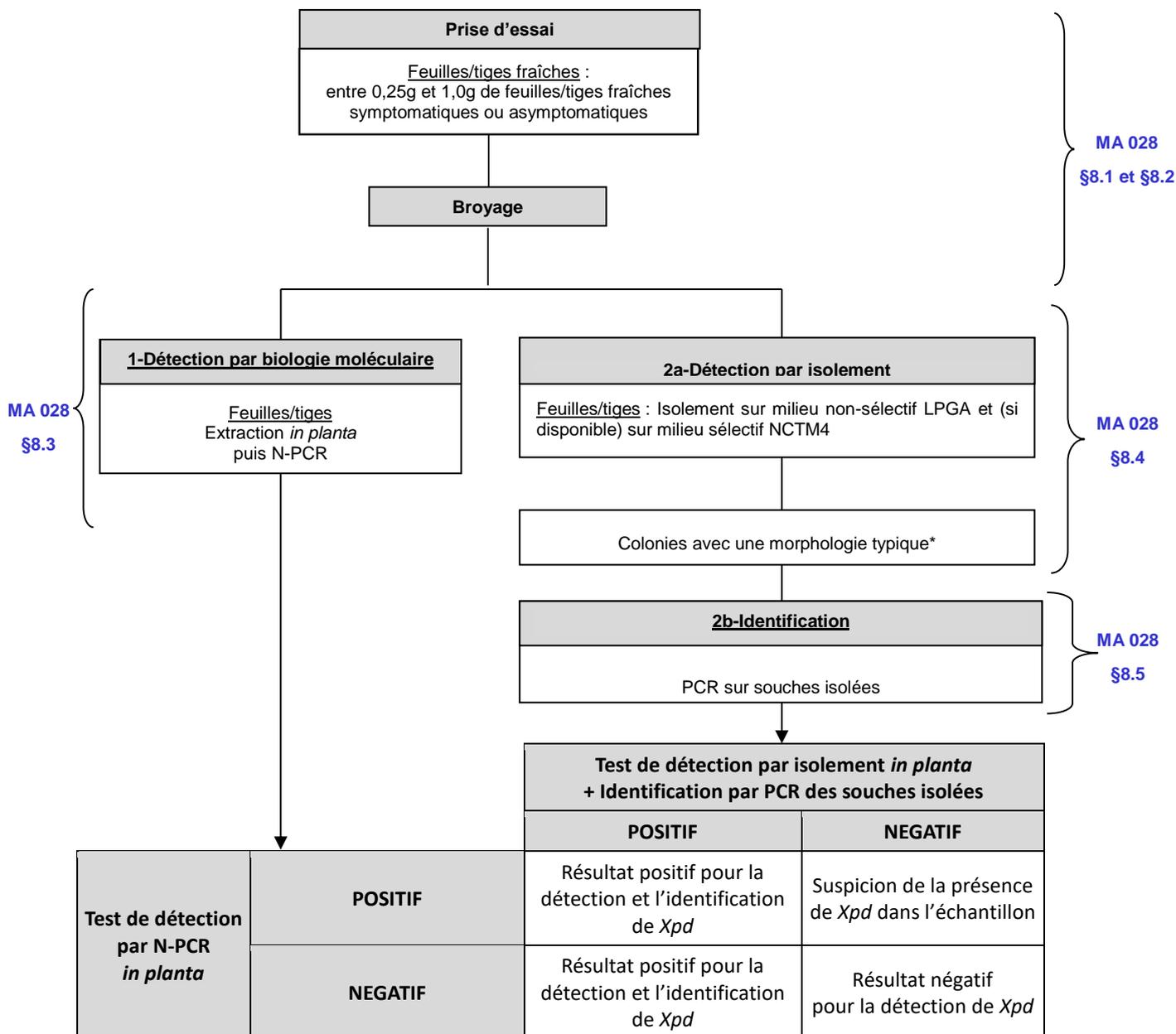
L'intérêt de combiner deux tests de détection est le suivant :

-la détection par N-PCR in planta permet un diagnostic rapide et permet en cas de résultat positif de guider la lecture des isolements (potentiellement difficiles à interpréter en présence de bactéries saprophytes), en contrepartie la technique présente un risque de faux-positifs ;

-la détection par isolement in planta + l'identification par PCR des souches isolées permettent de récupérer sur milieu de culture l'organisme cible (obligatoire dans le protocole de diagnostic OEPP (Anonymous 2009)) et de garantir le résultat de la N-PCR.

### Schéma de détection de Xpd

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



**Figure 2 :** Schéma de détection et d'identification de *Xanthomonas phaseoli* pv. *dieffenbachiae* sur feuilles et tiges d'anthuriums.

\*L'absence de colonies avec morphologie typique équivaut à un résultat d'isolement négatif.

Tous les tests intégrés dans la méthode 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.



## 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 contaminations ou de tout autre élément pouvant interférer sur le résultat (pour les tests de biologie moléculaire notamment : absence de nucléases, inhibiteurs de PCR, etc.).

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 juge satisfaisantes.

### 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 de biologie moléculaire).

Ces réactifs doivent être utilisés et, pour certains, contrôlés conformément à la méthode d'analyse MOA 022.

#### 5.2.1 Kit d'extraction d'ADN

La présente méthode a été caractérisée et validée en extrayant et purifiant l'ADN total de l'échantillon à l'aide du kit DNeasy® Plant mini kit de Qiagen, en suivant le protocole d'extraction « Plant Tissue » du fournisseur, en commençant par l'étape décrite dans le manuel: « Déposer 400µl de tampon AP1 et 4µl de RNase A dans chaque tube... ».

#### 5.2.2 Master mix

Les tests de N-PCR ont été validés avec le mélange réactionnel du kit Gotaq® Hot Start Polymerase (Promega). Ce réactif n'étant plus produit, le mélange réactionnel du kit Gotaq® G2 Hot Start Polymerase (Promega) a été validé et peut être utilisé en remplacement. Les validations ont été réalisées avec le tampon de master mix contenant le tampon de charge. Par ailleurs, le kit prêt à l'emploi produit par Quali plante (*Xpd* Nested End-Point PCR Master Mix), utilisé selon les préconisations du fournisseur, a également été évalué et donne des résultats équivalents. Il présente l'avantage de réduire le nombre de manipulations et donc le risque d'erreur et de contamination.



## 5.2.3 Oligonucléotides

### Séquences des amorces pour la N-PCR

**Tableau 3** : Séquences des amorces de la N-PCR.

Etape	Amorces	Sequence (5'-3')	Taille du fragment généré
Primaire	F : PXadU	AGGGCTCCCCATGCCGGAAT	1570 pb
	R : PXadL	ACGCAATGCGCAGGGGAAAT	
Nested	F : NXadU	AGCGCGGTACATTGTTGTTTCGT	785 pb
	R : NXadL	GCGGATCCTGACTGAGCAAAG	

*Remarque* : Ces amorces et leur utilisation en diagnostic ont fait l'objet d'un dépôt de brevet par le CIRAD en France (FR2848222) et aux Pays Bas (NL1024929CC2).

## 5.3 Tampons

### 5.3.1 Composition et préparation

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

- Tampons d'extraction (par exemple : ceux du DNeasy® Plant mini kit de Qiagen)
- Tampon de migration (par exemple : TAE ou TBE)
- Tampon de charge (si celui-ci n'est pas intégré au tampon du master mix cf. §5.2.2)

### 5.3.2 Conservation

Les préparations des tampons ainsi que leurs durées et conditions de conservation doivent être conformes aux recommandations du fournisseur. A défaut le laboratoire définira les conditions qu'il juge satisfaisantes.

## 5.4 Milieux de culture

Milieu de culture non-sélectif LPGA : recette disponible en annexe 1.

Milieu de culture semi-sélectif NCTM4 (Laurent et al. 2009) : recette disponible en annexe 1

### 5.4.1 Contrôle

Les milieux de culture sont des réactifs critiques pour la réalisation des isollements, en conséquence, chaque lot de fabrication d'un milieu (commercial ou fabriqué au sein du laboratoire), doit être contrôlé avant ou simultanément à sa première utilisation. Ces contrôles portent sur la qualité physique et microbiologique. Concernant le contrôle de qualité microbiologique, il sera vérifié a minima la bonne croissance de la souche cible.

### 5.4.2 Conservation

Les milieux de culture commerciaux doivent être stockés et conservés selon les recommandations du fournisseur.

En l'absence de préconisations, ou dans le cas de milieux fabriqués au sein du laboratoire, ceux-ci doivent être utilisés dans un délai de deux mois après fabrication. En cas de non utilisation dans les deux mois, un nouveau contrôle de conformité du milieu est réalisé. Le stockage des milieux doit être réalisé, à une température positive  $\leq 20^{\circ}\text{C}$ , de préférence à l'abri de la lumière.



Quelle que soit l'origine du milieu (commerciale ou interne au laboratoire), en cas de changement de couleur, de signe d'évaporation/déshydratation ou de prolifération microbienne, il convient d'éliminer tout le lot de milieu.

Remarque : dans le cas des milieux contenant des antibiotiques, il est préférable de les utiliser peu de temps après leur fabrication pour avoir une efficacité d'action optimale. Ils ne devront pas être utilisés au-delà d'un mois après leur fabrication (sauf indications contraires du fournisseur). Ils devront alors être conservés à une température positive  $\leq 20^{\circ}\text{C}$ , à l'abri de la lumière. Au moment de l'utilisation des milieux, il sera alors nécessaire d'attendre qu'ils soient revenus à température ambiante et de s'assurer de l'absence d'humidité (prévoir si besoin un séchage sous flux stérile).

## 5.5 Autres réactifs et consommables

### -Consommables à usage unique :

- Microcônes stériles avec et sans filtre de volume adapté
- Microtubes stériles de volume adapté
- Microtubes, barrettes ou plaques stériles pour PCR de volume adapté au thermocycleur utilisé

### -Anses stériles.

-**Ethanol 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

L'utilisation de témoins de manipulation est obligatoire pour la mise en œuvre de chaque test décrit dans la méthode. L'utilisation de ces témoins sert à valider le bon déroulement des différentes étapes de l'analyse. La nature des témoins à utiliser dans chaque test est décrite dans les paragraphes ci-après.

### 5.6.1 Pour la détection *in planta* par N-PCR

Conformément aux exigences de la méthode d'analyse MOA 022, les témoins à intégrer dans le test de N-PCR pour la détection *in planta* sont les suivants :

- un **témoin négatif de processus** (TS ou T-) : 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 (feuilles d'anthurium non infectées).  
*Remarque: il est possible d'utiliser des feuilles d'anthurium non infectées congelées comme témoins négatifs de processus.*
- 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 (feuilles d'anthurium infectées). Il donne au minimum l'assurance d'un déroulement correct de la manipulation. Pour chaque série d'analyses, on peut soit utiliser un échantillon de référence naturellement contaminé ou un échantillon artificiellement contaminé par dopage avec une souche *Xpd* de référence.

En complément du témoin positif de processus à concentration bactérienne élevée, il est conseillé, dans la mesure du possible, d'utiliser un **témoin positif de PCR** 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 permettra au sein du laboratoire 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,

- un **témoin négatif de PCR** (A- ou Teau) : il contient tous les éléments du mélange réactionnel mais aucun extrait d'ADN n'est ajouté, il est remplacé par de l'eau ; cela permet de vérifier l'absence de contamination au cours de la réaction de PCR.

*Remarque* : Dans la présente méthode, la souche utilisée comme souche Xpd de référence est la souche pathotype issue de collection internationale (souche LMG 695 = NCPPB 1833 = PD 992 : elle a été isolée sur anthurium au Brésil en 1965).

*D'autres souches issues de collections internationales ou isolées par le laboratoire, préalablement vérifiées sur milieux et en test moléculaire peuvent également être utilisées comme souches témoins de référence.*

*La manipulation de ces souches 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.*

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.

*Remarque* : Les travaux méthodologiques n'ayant pas révélé de problème particulier d'inhibition liée à la matrice anthurium, l'utilisation d'un témoin d'inhibition n'est pas exigée. Toutefois en cas de suspicion d'inhibition (résultat de N-PCR négatif et isolement positif), l'analyse de N-PCR peut être réitérée en incluant un témoin d'inhibition pour tester l'hypothèse d'inhibition. Selon les résultats obtenus, l'utilisation de ce témoin pourra être généralisée au sein du laboratoire.

### 5.6.2 Pour la détection in planta par isolement

Il est conseillé d'utiliser *a minima* comme témoins de processus pour l'isolement, les deux témoins de processus utilisés pour les tests PCR (le témoin négatif de processus et le témoin positif de processus cf. §5.6.1). Ces témoins doivent être isolés dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser.

### 5.6.3 Pour l'identification par PCR des souches isolées

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

- un **témoin négatif de processus** (T- ou 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+) : suspension bactérienne réalisée à partir d'une souche Xpd de référence (cf. §5.6.1), 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 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.



Prévoir un seul puits par témoin.

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

## 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, et notamment des tests de biologie moléculaire, le laboratoire disposera des appareils décrits dans la méthode d'analyse MOA 022.

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).

Tableau 4 : EMT par grandeur.

Grandeur	EMT
Volume	volume < à 10mL : EMT = $\pm 10\%$ volume $\geq$ à 10mL : EMT = $\pm 5\%$
Masse	EMT = 10%
pH	EMT = 0,3 unité pH
Température	incubateur : EMT = $\pm 3^\circ\text{C}$ réfrigérateur : EMT = $\pm 4^\circ\text{C}$ (pour une température cible de $+5^\circ\text{C}$ ) bain thermostaté : EMT = $\pm 3^\circ\text{C}$ thermocycleur* : EMT justesse = $\pm 1^\circ\text{C}$ ; EMT homogénéité = $\pm 2^\circ\text{C}$
Temps	EMT = 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

La méthode a été validée en utilisant, pour la matrice végétale de type feuille ou tige, un broyeur à roulement à billes (type Homex 6 de Bioreba), le broyage de l'échantillon se faisant dans un sachet de broyage en plastique, muni d'une gaze de filtration à mailles en nylon. Le broyat peut alors être récupéré directement dans le sachet. Toutefois, tout autre procédé de broyage permettant d'obtenir des résultats équivalents peut également être utilisé.

### 6.2 Thermocycleur

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 Appareillage et matériels pour le test d'isolement

Pour la mise en œuvre du test d'isolement bactérien, le laboratoire devra également disposer des appareils suivants :

- Incubateur bactériologique assurant une température de +28°C ;
- Enceinte réfrigérée à +5°C ;
- Incubateur (réfrigéré) ≤ 20°C ;
- PSM ou hotte stérile permettant d'assurer des conditions axéniques ;
- Congélateur : ≤ -18°C ;
- Autoclave.

## 7. Échantillons

### 7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Le laboratoire réalise l'analyse sur un minimum de 0,25g de matériel végétal frais et au maximum 1,0g de matériel végétal frais.

En dessous de 0,25g de matériel végétal, des réserves sont émises quant au résultat d'analyse si ce dernier est négatif.

Le matériel végétal doit arriver au laboratoire dans un état de fraîcheur approprié (feuilles turgescentes). Dans le cas contraire, le laboratoire émet des réserves sur tout résultat d'analyse négatif en précisant l'état dégradé de l'échantillon à la réception au laboratoire. Si les échantillons arrivent dans un état 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.

### 7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Le délai entre la réception de l'échantillon et le début de l'analyse doit être de préférence inférieur à 3 jours et ne doit pas dépasser 7 jours pour les échantillons frais prélevés dans de bonnes conditions. 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.

**Tableau 5** : Type de reliquats d'échantillons à conserver et conditions de leur conservation pour les besoins d'analyses contradictoires et /ou de confirmation.

Etapas	Type de reliquat	Conservation		Modalités d'envoi à un autre laboratoire le cas échéant
		Conditions	Durée	
<b>Prise d'essai</b>	Feuilles/tiges d'Anthurium	+5°C	<b>Tout résultat</b> : 15 jours après envoi du rapport	Sachets individuels fermés et clairement identifiés Température ambiante Transporteur express avec suivi
<b>Broyage</b>	Broyat végétal	+5°C	<b>Tout résultat</b> : 15 jours après envoi du rapport	Tubes / pots hermétiques clairement identifiés Température ambiante Transporteur express avec suivi
<b>Extraction d'ADN</b>	Extraits d'ADN	≤-18°C	<b>Résultat négatif</b> : 15 jours après envoi du rapport	Tubes hermétiques clairement identifiés Température ambiante Transporteur express avec suivi
			<b>Résultat autre que négatif</b> : 12 mois	
<b>Isolements bactériens</b>	Boîtes d'isolement/ souches isolées	+5°C	<b>Tout résultat</b> : 15 jours après envoi du rapport	Boîtes de culture parafilmées en conditionnement hermétiques et clairement identifiées Température ambiante Transporteur express avec suivi
<b>Identification PCR</b>	Souches bactériennes identifiées positivement, mises en collection	Selon les modalités de mise en collection (exemple : température ambiante pour les lyophilisats ; température ≤-18°C pour les cryobilles ou les suspensions bactériennes)	<b>Résultat positif</b> : 12 mois	Conditionnements hermétiques clairement identifiés Température ambiante Transporteur express avec suivi

## 8. Mode opératoire

L'ensemble des opérations décrites ci-après doit s'effectuer en portant des gants à usage unique.

### 8.1 Préparation des échantillons pour analyse

La prise d'analyse est constituée au minimum de 0,25g de matériel végétal frais et au maximum 1,0g de matériel végétal frais.

Après une décontamination rapide de surface à l'aide de papier absorbant imbibé d'alcool à 70°, prélever au scalpel les parties de végétal en bordure de lésions jeunes (sans inclure les nécroses) et les placer dans un sachet de broyage.



En l'absence de symptômes, le prélèvement se fait en bordure du limbe. Il est également possible, selon le contexte de la demande (exemple : certification de vitroplants) d'y associer une portion de tige pour détecter des infections latentes.

Entre chaque prise d'essai, l'opérateur veillera à désinfecter le matériel utilisé pour les prélèvements

## 8.2 Broyage

Broyer le matériel végétal dans de l'eau de qualité analytique stérilisée selon le ratio poids/volume de 1/20 soit 5mL d'eau pour 0,25g de matériel végétal (ou 10mL pour 0,50g ou encore 20mL pour 1,0g).

A partir du broyat végétal obtenu:

-des isolements sur boîtes de culture sont réalisés selon les indications du §8.4.

-2mL (approximativement) du broyat végétal obtenu sont transférés dans des tubes de type Eppendorf® pour la réalisation de l'extraction d'ADN telle que décrite au §8.3.1.

Remarque : L'embout porte-cône de la pipette doit être décontaminé entre chaque échantillon si celui-ci se trouve en contact avec le sachet de broyage. L'utilisation de cônes à pointe large peut faciliter le prélèvement du broyat le cas échéant. Enfin, pour des raisons pratiques, le volume nécessaire pour réaliser les isolements (50µL ou 50µL x 2 selon le cas) peut être prélevé à partir des 2mL prélevés pour l'extraction PCR.

Les tubes sont centrifugés environ 10 minutes à 20 000g afin de culoter les bactéries de préférence en conditions réfrigérées (meilleure tenue du culot). Eliminer le surnageant.

Ce culot peut être directement extrait, ou bien être conservé à +5°C pendant quelques heures avant extraction, ou encore être conservé à une température inférieure ou égale à -18°C pendant plusieurs semaines en attente de l'extraction.

Les reliquats de broyats sont conservés selon les modalités indiquées dans le tableau 5.

## 8.3 Détection in planta par N-PCR

La nested-PCR (ou PCR gigogne) consiste à faire deux PCR l'une après l'autre afin principalement d'améliorer le seuil de détection. La première PCR s'effectue sur un extrait d'ADN total du tissu végétal suspecté d'être infecté. La deuxième amplification se fait ensuite directement sur l'amplifiât précédemment obtenu, à l'aide d'un jeu d'amorces spécifiques, internes à la première paire utilisée.

**Chaque échantillon fait l'objet d'une extraction unique, mais chaque extrait doit être déposé deux fois soit au final 2 puits par échantillon (analyse de détection).**

### 8.3.1 Extraction d'ADN

L'ADN total de l'échantillon contenant l'ADN bactérien est extrait et purifié à l'aide d'un kit commercial. L'élution de l'ADN total se fait dans 100µl (à titre indicatif 2 x 50µl).

Les extraits d'ADN peuvent être conservés plusieurs semaines, à une température ≤-18°C, en attente de la réalisation de l'amplification.

Après utilisation, les tubes contenant les extraits d'ADN sont conservés selon les modalités indiquées dans le tableau 5.



### 8.3.2 PCR Primaire : mélange réactionnel et amplification

Établir soigneusement le plan de distribution (plan de plaque) et d'identification des extraits.

#### Mélange réactionnel

**Tableau 6** : Mélange réactionnel de la N-PCR - étape primaire.

Réactifs	[Solution-mère] (exemple)	[Puits]	Volume pour un puits (µl) (pour les concentrations de solutions-mères données)
Eau ultra pure			15,45
Tampon	5 X	1 X	5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,1 mM	1,1
dNTP	10 mM	0,1 mM	0,25
Amorce PxadU	10 µM	0,2 µM	0,5
Amorce PxadL	10 µM	0,2 µM	0,5
Taq	5U/µl	1U	0,2
<b>Total avant ajout ADN</b>			23
<b>ADN</b>			2
<b>Total avec ADN</b>			25

Remarque :

-Le volume final est de 25µl dans chaque puits soit 23µl de mélange réactionnel et 2µl d'ADN ou d'eau.

#### Programme d'amplification

**Tableau 7** : Programme d'amplification de la N-PCR - étape primaire.

	Température (°C)	Durée	Cycles
Dénaturation initiale	94	3 minutes	
Dénaturation	94	30 secondes	35
Hybridation	70	30 secondes	
Elongation	72	2 minutes	
Elongation finale	72	10 minutes	
Conservation	12	∞	

La taille des ampliâts générés est de 1570pb.



### 8.3.3 PCR Nested : mélange réactionnel et amplification

#### Mélange réactionnel

**Tableau 8** : Mélange réactionnel de la N-PCR - étape nested.

Réactifs	[Solution-mère] (exemple)	[Puits]	Volume pour un puits (µl) (pour les concentrations de solutions-mères données)
Eau ultra pure			16,45
Tampon	5 X	1 X	5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,1 mM	1,1
dNTP	10 mM	0,1 mM	0,25
Amorce NxadU	10 µM	0,2 µM	0,5
Amorce NxadL	10 µM	0,2 µM	0,5
Taq	5U/µl	1U	0,2
<b>Total avant ajout ADN</b>			24
<b>ADN</b>			1
<b>Total avec ADN</b>			25

#### Remarque :

-Le volume final est de 25µl dans chaque puits soit 24µl de mélange réactionnel et 1µl d'amplifiats de la PCR primaire ou d'eau.

-Lors de l'ajout des amplifiats de la PCR primaire, les tubes PCR doivent être ouverts avec précaution pour éviter la création d'aérosols susceptibles d'entraîner des contaminations croisées.

#### Programme d'amplification

**Tableau 9** : Programme d'amplification de la N-PCR - étape nested

	Température (°C)	Durée	Cycles
Dénaturation initiale	94	3 minutes	
Dénaturation	94	30 secondes	20
Hybridation	70	30 secondes	
Elongation	72	30 secondes	
Elongation finale	72	5 minutes	
Conservation	12	∞	

La taille des amplifiats générés est de 785pb.

### 8.3.4 Electrophorèse et révélation

Dans le cadre des analyses de détection réalisées sur extrait végétal, il n'est pas nécessaire de déposer sur gel les amplifiats à l'issue de la PCR primaire, seuls les amplifiats issus de la PCR nested sont déposés.

Déposer environ 10µL de l'amplifiât, soit directement soit mélangés à du bleu de charge (environ 2µL pour 10µL d'amplifiât) selon le type de tampon utilisé précédemment (cf. §5.3.1), sur un gel d'agarose à 1% (valeurs indicatives).



Un marqueur de taille moléculaire, dont l'intervalle encadre la taille des fragments attendus, doit être déposé sur chaque ligne de dépôt afin de définir la taille des fragments obtenus.

Effectuer l'électrophorèse dans du tampon de migration à une concentration identique à celle du tampon utilisé pour réaliser le gel (à titre indicatif, la migration peut se faire avec les paramètres suivants : 90 volts durant 1 heure).

La coloration du gel se fait dans un bain de bromure d'éthidium (BET) et la révélation sous UV. Il est conseillé d'effectuer une prise de vue du gel et d'utiliser une impression papier ou le fichier informatique pour analyser les résultats.

D'autres marqueurs d'ADN équivalents peuvent également être utilisés.

*Remarque* : Veiller à la protection des utilisateurs contre les UV (yeux, peau). Veiller également à la protection des utilisateurs lors de la manipulation du BET ou tout autre marqueur d'ADN par le port de gants nitriles. Tous les déchets ayant été en contact avec ces marqueurs d'ADN doivent être éliminés selon une procédure adaptée à ces déchets toxiques.

## 8.4 Détection in planta par isolement

### 8.4.1 Isolement

L'isolement se fait à partir du broyat pur *a minima* sur une boîte de milieu non sélectif LPGA, et si disponible, en plus sur une boîte de milieu sélectif NCTM4.

En conditions axéniques, prélever et déposer, par boîte de culture, 50µL du broyat végétal obtenu selon les indications du §8.2.

Réaliser un étalement par épuisement en 3 secteurs (isolement 3 secteurs) à l'aide d'une anse stérile.

L'isolement du témoin positif de processus doit s'effectuer de manière séparée, dans l'espace et/ou dans le temps, des isollements issus des échantillons à analyser, de façon à éviter toute contamination accidentelle des échantillons.

### 8.4.2 Incubation

Incuber les boîtes de culture LPGAensemencées à +28 °C pendant au moins 48h et les boîtes de culture NCTM4 à +28 °C pendant au moins 72h.

### 8.4.3 Lecture

Observer les boîtes après le temps de croissance indiqué au §8.4.2.

### 8.4.4 Repiquage pour identification

Tout échantillon présentant au moins une colonie typique de *Xpd* ou suspecte sur au moins une boîte de culture (quel que soit le milieu) doit faire l'objet d'une identification.

Les colonies typiques de *Xpd* ont les caractères décrits ci-après :

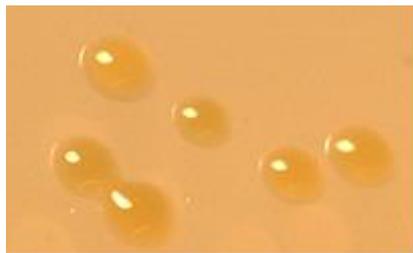


-sur **LPGA** : les colonies apparaissent en général après 48h. Elles sont petites, claires, jaunâtres. Le caractère jaune, muqueux et bombé de la colonie n'apparaît qu'au bout de quelques jours (cf. la photo ci-dessous). Les colonies doivent avoir la même morphologie que les colonies obtenues à partir du témoin positif de processus isolé sur milieu LPGA.



Colonies de *Xanthomonas phaseoli* pv. *dieffenbachiae* souche LB96 sur milieu LGPA après 72h de croissance à +28°C (source Anses LSV)

-sur **NCTM4** : la croissance est un peu plus lente : les colonies apparaissent en général après 72h. Les colonies présentent également un aspect jaune muqueux et bombé. Les colonies doivent avoir la même morphologie que les colonies obtenues à partir du témoin positif de processus isolé sur milieu NCTM4.



Colonies de *Xanthomonas phaseoli* pv. *dieffenbachiae* souche JV589 sur milieu NCTM4 après 72h de croissance à +28°C (source Anses LSV)

L'identification des colonies typiques de *Xpd* (ou suspectes) se fait à l'aide de la PCR d'identification. Pour ce faire, repiquer au moins une colonie typique (ou suspecte) par échantillon sur milieu LPGA. Laisser incuber à +28°C pendant environ 24h, pour obtenir une culture « fraîche » et se référer au §8.5.

**Remarque** : En cas de doute, ne pas hésiter à multiplier le nombre de repiquage pour identification par échantillon.

Les boîtes d'isolement et les souches isolées doivent être conservées selon les modalités indiquées dans le tableau 5.

## 8.5 Identification par PCR des souches isolées

Le test d'identification par PCR est lié à la méthode d'analyse MOA 022. Il ne peut être appliqué qu'en respectant les préconisations de cette méthode.

**Chaque souche isolée fait l'objet d'une suspension bactérienne et est déposée une fois, soit 1 puits par souche à identifier (analyse d'identification).**

### 8.5.1 Préparation des suspensions bactériennes

Re-suspendre, à l'aide d'une anse stérile, environ 1µL de la culture fraîche de 24h d'une colonie typique de *Xpd* ou suspecte (cf. §9.2.2) dans 1mL d'eau de qualité analytique stérilisée puis vortexer vigoureusement. Le tube peut alors être utilisé directement pour la réalisation de l'amplification ou stocké à une température



inférieure ou égale à -18°C en attente de réalisation de l'amplification. Après utilisation, les tubes contenant les suspensions bactériennes sont conservés selon les modalités indiquées dans le tableau 5.

*Remarque : L'étape de lyse thermique (ébullition du tube de la suspension bactérienne pendant au moins une minute puis mise dans la glace pendant quelques minutes et vortexage vigoureux) n'est pas maintenue dans cette version de la méthode car des tests de validation réalisés par le LNR ont montré l'équivalence des résultats avec ou sans lyse thermique. La lyse thermique peut toutefois être réalisée notamment si elle est justifiée par des contraintes organisationnelles de niveau de confinement (manipulation de bactéries inactivées à l'issue de cette étape).*

### 8.5.2 Amplification, électrophorèse et révélation

Pour les conditions d'amplification, d'électrophorèse et de révélation se référer aux indications des §8.3.2, §8.3.3 et §8.3.4, tout en tenant compte des indications suivantes.

Quand l'amplification est réalisée à partir d'une suspension bactérienne ou à partir d'ADN extrait de culture pure (par exemple à l'aide d'un kit commercial d'extraction d'ADN), la cible est largement excédentaire et des adaptations du protocole de détection sont possibles pour réduire le risque de contaminations. Ainsi il est possible :

- de réaliser uniquement l'amplification primaire et de poser le diagnostic sur la présence ou non d'un fragment d'ADN de 1570 pb après migration des amplifiats de la PCR primaire (cf. §8.3.2).
- de réaliser la nested-PCR, en diluant les amplifiats issus de la première étape au 1/100 dans de l'eau de qualité de biologie moléculaire.

L'utilisation de la nested-PCR dans les mêmes conditions que la détection sur extrait végétal reste possible, en prenant toutes les précautions nécessaires pour éviter les contaminations.

## 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 Pour la détection in planta par N-PCR

L'analyse de N-PCR est validée si les conditions ci-dessous sont vérifiées.

**Tableau 10** : Résultats attendus pour les différents témoins utilisés en N-PCR.

Type de contrôle	Résultats attendus**		
	Puits 1	Puits 2	Final
Témoin négatif de processus (TS)	-	-	<b>NEGATIF</b>
Témoin positif de processus (T+)	+	+	<b>POSITIF</b>
Témoin négatif d'amplification (A- ou Teau)	-	(-*)	<b>NEGATIF</b>

\* La duplication de ce témoin est facultative.

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



### 9.1.2 Pour la détection in planta par isolement

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

- s'assurer de l'absence de colonies typiques de *Xpd* sur les boîtes d'isolement du témoin négatif de processus ;
- s'assurer de la présence de colonies typiques de *Xpd* sur les boîtes d'isolement du témoin positif de processus.

### 9.1.3 Pour l'identification par PCR des souches isolées

L'analyse de PCR d'identification est validée si les conditions ci-dessous sont vérifiées.

**Tableau 11:** Résultats attendus pour les différents témoins utilisés en PCR d'identification.

Type de contrôle	Résultat attendu*	
	Puits PCR	Final
Témoin négatif de processus (TS)	-	<b>NEGATIF</b>
Témoin positif de processus (T+)	+	<b>POSITIF</b>
Témoin négatif d'amplification (A- ou Teau)	-	<b>NEGATIF</b>

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

## 9.2 Calculs et expression des résultats

### 9.2.1 Pour la détection in planta par N-PCR

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 :

**Tableau 12 :** Interprétation des résultats des échantillons en nested-PCR.

Analyse		Résultat	Interprétation
Puits 1	Puits 2		
+	+	<b>POSITIF</b>	Test positif
+	-	<b>PCR (primaire et nested) à refaire.</b> Si à nouveau au moins 1 positif sur 2, le test est interprété comme positif.	
-	-	<b>NEGATIF</b>	Test négatif



### 9.2.2 Pour l'identification par PCR des souches isolées

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 :

**Tableau 13** : Interprétation des résultats des échantillons en N-PCR d'identification.

Analyse	Résultat	Interprétation
Puits		
+	<b>POSITIF</b>	Test positif*
-	<b>NEGATIF</b>	Test négatif

\* Une étape de restriction enzymatique (Robène-Soustrade et al. 2006) peut être réalisée sur les amplifiats de la PCR primaire afin de distinguer les souches *Xpd* des souches *Xanthomonas phaseoli pv. syngonii*, très proches génétiquement des souches *Xpd*, mais non pathogènes de l'anthurium. A noter que les souches *Xanthomonas phaseoli pv. syngonii* peuvent également être distinguées lors de l'isolement car elles sont plus longues à pousser que les souches *Xpd* et n'ont pas rigoureusement le même aspect (blanchâtres) sur LPGA et sur NCTM4.

Tout échantillon présentant au moins une souche isolée positive est considéré comme positif.

Toute souche bactérienne identifiée positivement doit être conservée selon les modalités indiquées dans le tableau 5.

### 9.2.3 Pour la méthode globalement

Le schéma de détection de *Xpd* implique la mise en œuvre simultanément de **deux tests de détection et (selon le résultat de l'isolement) d'un test d'identification** (cf. figure 2) :

- 1) Détection *in planta* par nested-PCR conventionnelle
- 2) Détection *in planta* par isolement (à partir du même broyat)
- 3) Identification par PCR des souches isolées à l'étape précédente

Les résultats combinés de ces tests s'interprètent de la façon suivante :

**Tableau 14** : Interprétation des résultats combinés des deux tests de détection.

		Test de détection par isolement <i>in planta</i> + Identification par PCR des souches isolées	
		POSITIF	NEGATIF
Test de détection par nested-PCR <i>in planta</i>	POSITIF	Résultat positif pour la détection et l'identification de <i>Xpd</i>	Suspicion de la présence de <i>Xpd</i> dans l'échantillon
	NEGATIF	Résultat positif pour la détection et l'identification de <i>Xpd</i>	Résultat négatif pour la détection de <i>Xpd</i>



Ainsi *Xpd* est détecté et identifié dans les échantillons pour lesquels les deux tests de détection et le test d'identification donnent un résultat positif.

*Xpd* est non détecté dans les échantillons pour lesquels les deux tests de détection (pouvant inclure le test d'identification) donnent un résultat négatif.

En présence de résultats discordants entre les 2 tests de détection :

-*Xpd* est détecté et identifié dans les échantillons pour lesquels le test de détection par isolement *in planta* + l'identification par PCR des souches isolées sont positifs même si le test de détection par N-PCR *in planta* est négatif. En effet un taux de contamination très faible ou la présence d'inhibiteurs de la PCR dans la matrice d'anthurium peut expliquer des faux-négatifs en N-PCR. Il est recommandé de mettre en œuvre des analyses complémentaires au sein du laboratoire afin d'expliquer les faux-négatifs obtenus en N-PCR (comptage bactérien, répétition de l'analyse en incluant un témoin d'inhibition).

-En cas de résultat positif avec le test de détection par N-PCR *in planta* mais négatif avec le test de détection par isolement *in planta* (pouvant inclure l'identification par PCR des souches isolées), la présence de la bactérie est suspectée.

La formulation des résultats sur le rapport d'analyse se fait de la façon suivante (ou selon une formule équivalente) :

**Tableau 15** : Formulation des résultats de détection et d'identification.

		Test de détection par isolement <i>in planta</i> + Identification par PCR des souches isolées	
		POSITIF	NEGATIF
Test de détection par nested-PCR <i>in planta</i>	POSITIF	Rapport mentionnant : <i>X. p. dieffenbachiae</i> détecté et identifié	Rapport mentionnant : Suspicion de la présence de <i>X. p. dieffenbachiae</i> dans l'échantillon
	NEGATIF	Rapport mentionnant : <i>X. p. dieffenbachiae</i> détecté et identifié	Rapport mentionnant : <i>X. p. dieffenbachiae</i> non détecté

**Reliquats d'échantillons** : Voir §7.3.



## 10. Caractéristiques de performance de la méthode

Synthèse des caractéristiques de performance extraite du rapport de validation établi par le LNR sous la référence Rapport de validation interne Xad 2008.

**Tableau 16** : Synthèse des caractéristiques de performance de la méthode de détection de *Xpd* sur *Anthurium* spp. par nested-PCR et par isolement suivi d'une identification par PCR des souches isolées.

Caractéristique	Paramètre	Valeur ou résultat obtenu lors de la caractérisation	Principales informations relatives aux modalités de réalisation de la caractérisation
Sensibilité	Pourcentage d'échantillons détectés parmi les échantillons cibles	100%	50 souches bactériennes cibles testées en duplicat représentatives de la diversité géographique, génétique, d'une diversité de plantes hôtes et d'années d'isolement.
Spécificité	Pourcentage d'échantillons non détectés parmi les échantillons non-cibles	96%	53 souches bactériennes ou échantillons non-cibles testés en duplicat.
Exactitude	Pourcentage de vrais positifs et de vrais négatifs parmi des échantillons cibles et des échantillons non-cibles	98%	50 souches bactériennes cibles testées en duplicat et 53 souches bactériennes ou échantillons non-cibles testés en duplicat.
Seuil de détection	Niveau de concentration le plus bas pour lequel tous les résultats (100%) sont positifs	$[5.10^3 ; 5.10^4]$ CFU.mL <sup>-1</sup> pour la détection par N-PCR $[5.10^2 ; 5.10^3]$ CFU.mL <sup>-1</sup> pour la détection par isolement	6 niveaux de contamination (0-10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup> 10 <sup>6</sup> ) CFU.mL <sup>-1</sup> x 4 souches cibles différentes représentatives de la diversité
Répétabilité	Pourcentage d'accords entre répliquats d'un même échantillon.	95%	6 niveaux de contamination (0-10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup> 10 <sup>6</sup> ) CFU.mL <sup>-1</sup> x 4 souches cibles différentes représentatives de la diversité
Reproductibilité	Probabilité de trouver le même résultat pour deux échantillons identiques analysés dans deux laboratoires différents.	93%	Test interlaboratoire comprenant 15 laboratoires différents portant sur 4 échantillons différents (8 répliquats par échantillon et par laboratoire) constitués de broyats d'anthurium sain dopés ou non par des cibles ou non-cibles à différents niveaux de contamination.



## Annexe 1 – Recette des milieux utilisés pour la détection de Xpd

### Milieu LPGA :

Extrait de levure : 7.0 g  
Bactopeptone : 7.0 g  
Glucose : 7.0 g  
Agar : 18.0 g  
Eau distillée : 1.0 L  
pH = 7.2.

*A titre indicatif, l'ajout de 3ml de soude 1N par litre de milieu permet d'obtenir un pH d'environ 7,2*

Stériliser par autoclavage.

*Remarque : Après autoclavage et avant de couler le milieu, possibilité d'incorporer un antifongique (par exemple : cycloheximide à 50 mg/L ou propiconazole à 20 mg/L).*

### Milieu NCTM4 :

Extrait de levure : 7.0 g  
Bactopeptone : 7.0 g  
Glucose : 7.0 g  
Agar : 18.0 g  
Eau distillée : 1.0 L  
pH = 7.2.

*A titre indicatif, l'ajout de 3ml de soude 1N par litre de milieu permet d'obtenir un pH d'environ 7,2.*

Stériliser par autoclavage.

Après autoclavage et avant de couler le milieu, ajouter stérilement les antibiotiques et produits suivants à partir de solutions mères au milieu en cours de refroidissement (mais encore en surfusion à une température  $\leq 50^{\circ}\text{C}$ ):

Pivmécillinam<sup>1</sup> : 100 mg  
Céphalexine<sup>2</sup> : 50 mg  
Triméthoprime<sup>3</sup> : 10 mg  
Néomycine<sup>1</sup> : 3 mg  
Propiconazole (20 mg/L) : 80  $\mu\text{L}$

---

<sup>1</sup> Dilution dans l'eau

<sup>2</sup> Dilution dans la soude

<sup>3</sup> Dilution dans l'éthanol 70°



## Bibliographie

- Anonymous. 2003. Microbiology of Foods and Animal Feeding Stuffs-Protocol For the Validation of Alternative Methods In *EN ISO 16140*, edited by AFNOR. La Plaine Saint-Denis, France.
- Anonymous. 2009. EPPO standards-Diagnostic protocols for regulated pests-*Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*. In *PM7/23(2)*, edited by EPPO.
- Chabirand A., E. Jouen, O. Pruvost, F. Chiroleu, B. Hostachy, M. Bergsma-Vlami, G. Bianchi, L. Cozzolino, J. Elphinstone, M. Holeva, F. Manole, P. Martini, H. Matouskova, J. Minatchy, G. Op de Beeck, F. Poliakoff, L. Sigillo, F. Siverio, J. Van Vaerenbergh, M. Laurentie, and I. Robène-Soustrade. 2013. "Comparative and collaborative studies for the validation of a Nested PCR for the detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* from anthurium samples." *Plant Pathology*.
- Constantin E.C., Cleenwerck, I., Maes, M., Baeyen, S., Van Malderghem, C., De Vos, P., Cottyn, B. (2016). "Genetic characterisation of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex". *Plant Pathology* 65, 792-806.
- Cottyn B., E.C. Constantin and M.Maes. 2018. "Consequences of the taxonomic revision of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* and of the analysis of its associated pathogenicity for the recommendation of regulation (EPPO A2 List)." *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* (2018) 48 (2), 242–244.
- Laurent P., A. Chabirand, E. Jouen, I. Robène-Soustrade, L. Gagnevin, B. Hostachy, and O. Pruvost. 2009. "A new semi-selective medium for the isolation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, the etiological agent of anthurium bacterial blight." *Letters in Applied Microbiology* 49 (2):210-16. doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02643.x.
- Rademaker J.L.W., F.J. Louws, M.H. Schultz, U. Rossbach, L. Vauterin, J. Swings, and F.J. De Bruijn. 2005. "A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*." *Phytopathology* 95 (9):1098-1111.
- Robène-Soustrade I., P. Laurent, L. Gagnevin, E. Jouen, and O. Pruvost. 2006. "Specific Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* in Anthurium (*Anthurium andreaeanum*) Tissues by Nested PCR." *Applied and Environmental Microbiology* 72 (2):1072-8. doi: 10.1128/AEM.72.2.1072-1078.2006.