

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA050 – version 1

Octobre 2024

Détection d'*Erwinia amylovora* sur plantes hôtes symptomatiques par isolement et identification de la souche

Laboratoire de la santé des végétaux

Laboratoire national de référence : « Mandat Toutes bactéries phytopathogènes sauf exceptions¹ »

¹ Les exceptions sont mentionnées dans l'arrêté ministériel en vigueur désignant les laboratoires nationaux de référence dans le domaine de la santé publique phytosanitaire.

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
BL/05/07 a	Sans objet	Mars 2005	Méthode d'analyse BL/05/07 version a
V1	majeure	Octobre 2024	<ul style="list-style-type: none"> - Optimisation du nombre de tests d'identification des isolats afin de limiter le nombre de tests sur les analyses courantes et de ne conserver que ceux nécessaires et suffisants sans perte de fiabilité des résultats (5 tests dont séro-agglutination). - Suppression du milieu de culture CCT - Intégration d'un test de PCR en temps réel selon Pirc <i>et al.</i>, 2009 pour augmenter le niveau de fiabilité du protocole d'identification quand les tests biochimiques et le test de séro-agglutination ne sont pas suffisants, en particulier sur <i>Pyrus pyrifolia</i>. - Suppression du test de pouvoir pathogène - Reformulations

*La version 1 a fait l'objet d'une consultation du 01/08/2024 au 16/09/2024 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 Bactériologie, Virologie et détection des OGM

Laboratoire National de Référence « **Mandat Toutes bactéries phytopathogènes sauf exceptions²**»

Adresse : 7 rue Jean Dixméras - 49044 Angers CEDEX 01

Contact : LSV.UBVO@anses.fr

² Les exceptions sont mentionnées dans l'arrêté ministériel en vigueur désignant les laboratoires nationaux de référence dans le domaine de la santé publique phytosanitaire.

Sommaire

Avant-propos	3
Introduction	5
Avertissements et précautions de sécurité	6
1. Objet et domaine d'application	7
2. Documents de référence	8
3. Termes, sigles et définitions	8
4. Principe de la méthode	9
5. Réactifs	10
5.1 Eau.....	10
5.2 Milieux de culture.....	10
5.3 Réactifs et solutions pour l'identification d'isolats.....	11
5.4 Autres réactifs et consommables.....	11
5.5 Contrôles et témoins.....	12
6 Appareillage et matériels	13
6.1 Equipements pour le test d'isolement.....	13
6.2 Equipements pour l'amplification.....	13
6.3 Stockage des échantillons et des ADN.....	14
7 Échantillons	15
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons.....	15
7.2 Conservation des échantillons avant analyse.....	15
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse.....	15
8 Mode opératoire	17
8.1 Préparation des échantillons pour analyse.....	17
8.2 Isolement.....	17
8.3 Identification par tests rapides.....	18
8.4 Identification par PCR en temps réel selon Pirc <i>et al.</i> , 2009.....	19
9 Résultats	21
9.1 Contrôle de la validité des résultats.....	21
9.2 Calculs et expression des résultats.....	22
10 Caractéristiques de performance de la méthode	24
10.1 Tests rapides d'identification.....	24
10.2 Identification par la PCR en temps réel, Pirc <i>et al.</i> (2009).....	24
Annexe 1 : Milieux de culture et tampon	26
Annexe 2 : Modes opératoires des tests rapides	29
1. Test à la potasse, indicateur du GRAM (Suslow <i>et al.</i> , 1982).....	29
2. Test de mise en évidence de l'activité cytochrome C oxydase (Klement <i>et al.</i> , 1990).....	29
3. Test de fluorescence sur King B (Schaad <i>et al.</i> , 2001).....	29
4. Test d'hypersensibilité sur tabac (HST) (Schaad <i>et al.</i> , 2001).....	30
5. Test de séro-agglutination (OEPP, 2022).....	30
Bibliographie	32

Introduction

Erwinia amylovora (Burrill, 1883) Winslow *et al.*, 1920 (Ea) est la bactérie responsable du feu bactérien chez la plupart des espèces végétales appartenant à la sous-famille des *Maloideae* au sein de la famille des *Rosaceae*. Cette maladie affecte gravement les arbres fruitiers à pépins (pommier, poirier, néflier, cognassier). Les *Maloideae* d'ornement (cognassier du japon, cotonéaster, aubépine, sorbier, alisier, cormier, photinia, pommier et poirier d'ornement) ainsi que les *Rubus* peuvent également être infectés et servir de réservoir à la maladie.

Le symptôme le plus commun est un brunissement suivi d'un dépérissement des (jeunes) rameaux atteints qui se recourbent sous forme de crosse. Ces symptômes peuvent être accompagnés d'exsudats bactériens en période de croissance et en présence de forte hygrométrie atmosphérique.

Ea est présente en France métropolitaine.

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 exécutées par du personnel ayant reçu une formation appropriée.

L'exigence de confinement pour la manipulation de formes viables de cet agent pathogène doit être en accord avec la réglementation en vigueur dans la région où se situe le laboratoire d'analyse.

La bactérie Ea n'est pas connue pour être pathogène pour l'homme. Sa manipulation ne requiert donc pas de précautions particulières en termes d'hygiène et de sécurité des opérateurs.

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.

Tout fragment de matériel végétal (quel que soit son statut) et isolat bactérien en résultant doivent être détruits par autoclavage ou tout autre moyen inactivant les bactéries, ainsi que tous les consommables avec lesquels ils ont été en contact.

Tout matériel / équipement utilisé lors du processus doit être désinfecté.

1. Objet et domaine d'application

La méthode concerne la détection et l'identification des souches d'Ea responsable du feu bactérien sur *Maloideae* sur végétal symptomatique tel que feuilles, rameaux feuillés, tiges, fleurs ou fruits (Figure 1 et <https://gd.eppo.int/taxon/ERWIAM/photos>). Cette méthode qualitative permet l'isolement direct de colonies sur milieux nutritifs.

Après extraction des bactéries par dilacération et macération des tissus végétaux prélevés, l'isolement est réalisé sur milieu. L'utilisation de milieux nutritifs favorise le développement des colonies bactériennes dont celui d'Ea, cette bactérie ne présentant pas de difficulté à se multiplier sur milieu artificiel.

Les colonies suspectes isolées sont identifiées par des tests nécessaires et suffisants (biochimique, sérologique, moléculaire). L'identification moléculaire permet de distinguer Ea d'*Erwinia pyrifoliae* isolée de poirier en Chine (Kim *et al.* ; 1999, 2001) et d'*Erwinia pyriflorinigrans* isolée en Espagne (Lopez *et al.*, 2011), ces deux dernières donnant un résultat faussement positif au test sérologique d'agglutination.



Figure 1 : Symptôme provoqué par Ea sur tige et feuilles de poirier (source Anses LSV)

Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme non porteurs d'Ea ou porteurs à un niveau trop faible pour être mis en évidence par la technique utilisée.

Les échantillons pour lesquels une réponse positive est obtenue sont considérés comme porteurs d'Ea.

2. Documents de référence

- MOA 022 : 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

3. Termes, sigles et définitions

Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans la présente méthode est issu des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP...).

4. Principe de la méthode

Le principe de la méthode est présenté dans le schéma de détection ci-dessous :

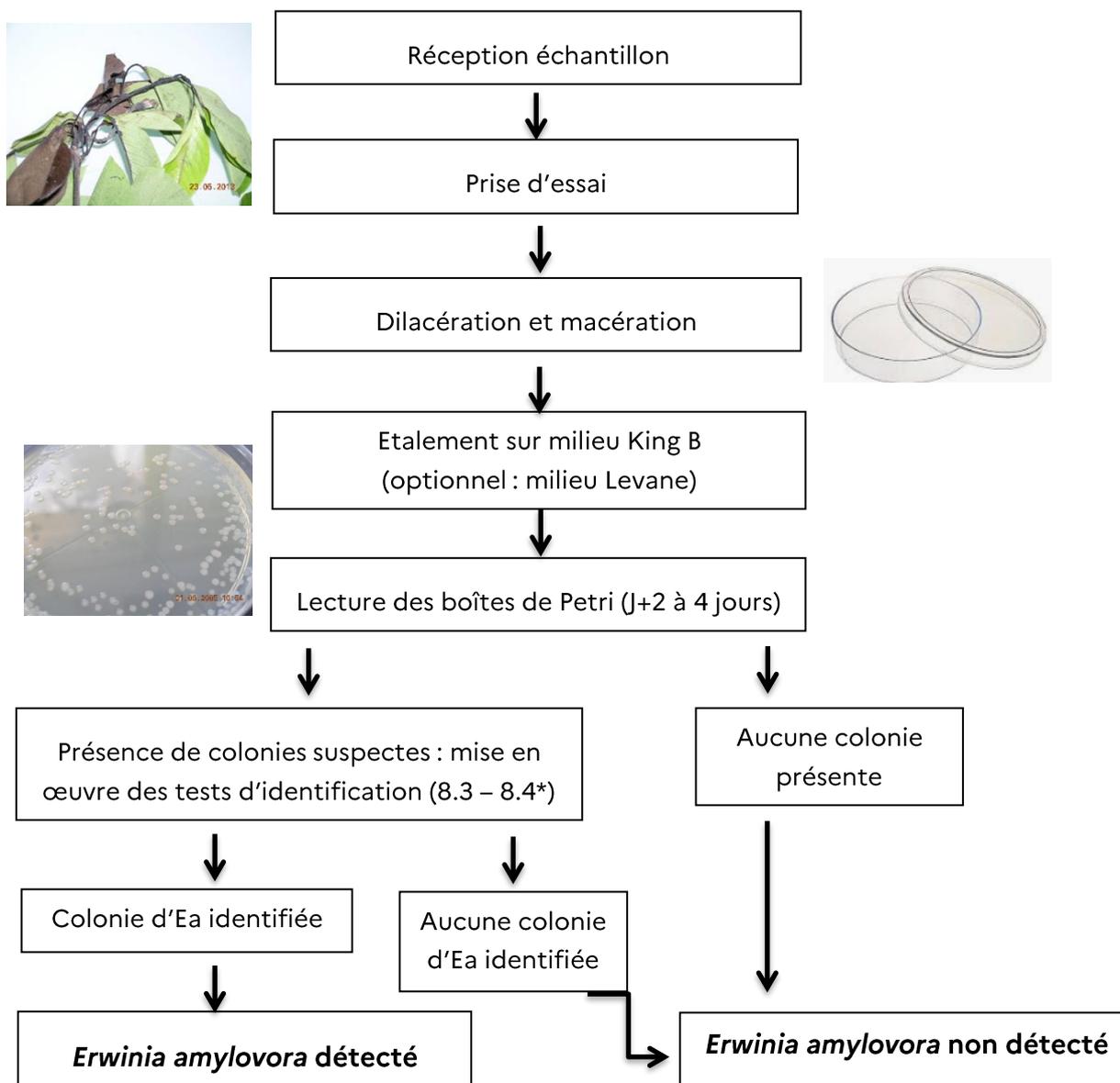


Figure 2 : Principe de la méthode de détection d'Ea

*obligatoire sur *Pyrus pyrifolia*.

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 de conservation qu'il juge optimales.

5.1 Eau

L'eau utilisée pour la préparation des milieux de culture ainsi que pour les étapes de préparation des échantillons doit être de qualité « analytique » (i.e. déminéralisée, distillée, osmosée, ...) garantissant d'atteindre les critères de performance attendus pour les tests, et stérile pour la préparation des échantillons (dilacération/macération).

L'eau ultrapure utilisée pour les étapes de PCR doit présenter une qualité suffisante pour une utilisation en biologie moléculaire (de type de qualité DNase, RNase free).

5.2 Milieux de culture

Les milieux spécifiques à la réalisation de cette méthode sont décrits ci-après.

- Pour l'isolement et le repiquage (et conservation à court terme): utilisation du milieu King B systématiquement. De plus, l'utilisation du milieu Levane est conseillée en complément lorsque les échantillons ne sont pas dans des conditions optimales pour l'analyse: suspicion de faible contamination, présence importante de saprophytes suspectée pouvant être source d'inhibition sur un des 2 milieux.
- Pour le test de fluorescence : milieu King B

Leurs compositions, préparations, modalités de contrôle, conservation et conditions d'emploi sont décrites en annexe 1.

5.3 Réactifs et solutions pour l'identification d'isolats

5.3.1 Tests biochimiques

- Réactif pour la mise en évidence d'une activité cytochrome C oxydase (solution aqueuse à environ 1% d'oxalate de N,N-diméthyl paraphénylène diamine) et papier filtre, ou réactif prêt à l'emploi.
- Solution de potasse (solution aqueuse à 3% de KOH).

5.3.2 Test d'agglutination

- Antisérums polyclonaux dirigés contre Ea (dilués à environ 5 à 10 % dans le PBS) : la référence recommandée est Prime Diagnostics Eam-I. D'autres antisérums peuvent être utilisés sous réserve de contrôle de performance en terme d'inclusivité et d'exclusivité sur 5 souches cibles et 5 non cibles (différentes d'*E. pyriformis* et *E. piriflorinigrans*).
- Solution tampon de PBS (voir annexe 1).

5.3.3 Test de PCR en temps réel (Pirc et al., 2009)

Tableau 1 : Oligonucléotides

Gène	Amorces/ sonde	Séquences (5'-3')	Taille amplicon
Ams (amsC gene)	Ams116F	TCC CAC ATA CTG TGA ATC ATC CA	74 pb
	Ams189R	GGG TAT TTG CGC TAA TTT TAT TCG	
	Ams141T	FAM-CCA GAA TCT GGC CCG CGT ATA CCG-TAMRA	

- D'autres fluorochromes rapporteurs peuvent être utilisés pour chaque sonde, sous réserve que le fluorochrome extincteur associé soit adapté.
- Les amorces doivent être au minimum de qualité RP cartridge et la sonde de qualité HPLC (exemples des critères de qualité du fournisseur Eurogentec).

Le test de PCR temps réel Pirc a été caractérisé et validé avec le mélange réactionnel du kit TaqMan universal PCR master Mix 2 x (Applied Biosystems) avec les thermocycleurs Applied Biosystems 7500 Fast ; C1000 Touch / Bloc CFX96 Real optics module Bio-Rad, Agilent Stratagene Mx 3005 P et Agilent Aria Mx.

5.4 Autres réactifs et consommables

- Consommables à usage unique : boîtes de Petri stériles avec ergot (diamètre 90 mm), microcônes stériles de volume adapté, microtubes stériles de volume adapté, barrettes ou plaques stériles pour PCR de volume adapté au thermocycleur utilisé, anses d'inoculation stériles de volume 10 µL, seringues et aiguilles stériles (test d'hypersensibilité sur tabac)
- Ethanol 70% : désinfection superficielle du végétal.
- Plant de tabac (*Nicotiana tabacum* variété *Xanthi*)

5.5 Témoins

L'utilisation de témoins de manipulation 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.

5.5.1 Isolement et identification biochimique

Le contrôle des milieux de culture et des milieux utilisés pour les tests biochimiques permet de maîtriser le processus de détection par isolement sur milieu nutritif et d'identification de la souche (cf. annexe 1).

5.5.2 Identification par PCR

Les témoins à intégrer dans le test de PCR pour l'identification des souches isolées sont les suivants:

- un témoin positif d'amplification (A+) : suspension bactérienne d'environ 10^6 - 10^7 ufc/mL réalisée à partir d'une souche Ea de référence*, traitée dans des conditions similaires aux suspensions bactériennes à analyser Ce témoin donne au minimum l'assurance d'un déroulement correct de la manipulation. Remarque: il est possible d'utiliser une suspension bactérienne positive préparée à l'avance et/ou inactivée.
- un témoin négatif d'amplification (A-) : 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 témoins peuvent être ajoutés si nécessaire et sont définis par la méthode MOA 022.

* souches provenant d'une collection de référence type CIRM - CFBP : Centre International de Ressources Microbiennes – Collection Française de Bactéries associées aux Plantes

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.

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 2 ci-après (dans le cas contraire, des spécifications sont précisées dans le texte de la méthode).

Tableau 2 : EMT par grandeur

Grandeur	EMT
Volume	EMT définies par la MOA022 version en vigueur ou EMT normes ISO 8655
Masse	EMT = 10%
pH	EMT = 0,3 unité pH
Température	Incubateur : EMT = $\pm 3^{\circ}\text{C}$ Thermobloc, bain à sec, bain-marie : EMT = $\pm 5^{\circ}\text{C}$ Enceinte réfrigérée : 5°C et EMT = $\pm 4^{\circ}\text{C}$ Congélateur : $\leq -18^{\circ}\text{C}$ Thermocycleur* : EMT justesse = $\pm 1^{\circ}\text{C}$; EMT homogénéité = $\pm 2^{\circ}\text{C}$

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

En plus de l'appareillage courant, le matériel suivant est jugé nécessaire pour certaines phases de l'analyse :

6.1 Equipements 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 $+25^{\circ}\text{C}$;
- Poste de Sécurité Microbiologique (PSM) ou bec Bunsen ou électrique permettant d'assurer des conditions axéniques ;
- Congélateur : $\leq -18^{\circ}\text{C}$;
- Autoclave
- Lampe UV-A ou lampe de Wood pour test de fluorescence
- Bain-marie ou bain à sec (100°C),
- Pipettes de volumes adaptés (plage de 1 à 5 mL) ou distributeur
- Scalpel et pince de dissection.

6.2 Equipements pour l'amplification

- Pipettes automatiques (plage de mesure de $0,5 \mu\text{L}$ à 1 mL)

- Appareil de PCR en temps réel et ordinateur de pilotage capables de mesurer la fluorescence des fluorochromes employés (méthode validée avec les appareils C1000 Touch thermal cycler / Bloc CFX96 Real optics module BIORAD, Applied Biosystems 7500 Fast, Agilent Stratagene Mx 3005 P, Applied QuantStudio 3 et Agilent Aria Mx.

6.3 Stockage des échantillons et des ADN

- Congélateur (température $\leq -18^{\circ}\text{C}$)
- Enceinte réfrigérée (température = 5°C)

7 Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

L'analyse étant réalisée sur des végétaux présentant des symptômes, la bactérie-cible est supposée être en excès dans les zones atteintes mais non nécrosées de la plante. Il est donc particulièrement important de disposer de matériel fraîchement prélevé (de l'ordre de 7 jours calendaires maximum entre prélèvement pour prise d'essai en vue d'analyse de première intention) et dont les rameaux ne sont pas totalement desséchés.

Pour que les échantillons soient acceptés sans réserve, les éléments suivants doivent être respectés:

- Le matériel végétal doit arriver au laboratoire dans un état de fraîcheur approprié (rameaux feuillés ou floraux non totalement desséchés, ni en cours de décomposition),
- L'échantillon est constitué d'au moins une feuille, d'un rameau, d'une tige, d'une fleur ou d'un fruit présentant des symptômes,
- Le temps entre le prélèvement et l'arrivée au laboratoire doit être le plus réduit possible (de préférence moins de 5 jours calendaires). Si les échantillons ne sont pas envoyés le jour même, ils doivent être conservés au frais avant l'envoi,
- Le transport peut être réalisé à température ambiante,
- Chaque échantillon est conditionné individuellement dans un emballage hermétique (référence figurant sur la fiche de demande d'analyse et sur l'emballage). Toutes les mesures doivent être prises pour conserver l'intégrité de l'échantillon et éviter les contaminations par d'autres échantillons.

Dans les cas contraires, le laboratoire informe le client dans les plus brefs délais en précisant les raisons du refus d'analyse.

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 7 jours calendaires pour les échantillons frais prélevés dans de bonnes conditions. L'échantillon devra pendant ce temps être conservé en enceinte réfrigérée à +5°C.

7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Cas d'un échantillon négatif : sauf mention contraire explicite ou impossibilité technique avérée, les laboratoires doivent conserver les reliquats pertinents (nature, quantité et qualité) de matériel soumis à analyse, dans des conditions appropriées garantissant leur intégrité, au minimum jusqu'au quinzième jour ouvrable suivant l'envoi au demandeur d'un rapport d'analyse pour éventuellement permettre la demande d'une analyse contradictoire par le client.

Cas d'un échantillon positif : l'ensemble des reliquats pertinents (souche isolée, extrait d'ADN) doit être conservé pendant une durée minimale de 12 mois, sauf pour les parties éventuellement transmises au laboratoire national de référence, à qui est alors transféré la charge de conservation des reliquats.

Conservation d'une souche isolée : toute souche isolée d'un échantillon positif doit être conservée par une méthode de conservation bactérienne à long terme (type congélateur $\leq -18^{\circ}\text{C}$ ou lyophilisateur). A titre d'exemple, ensemercer, par piqûre centrale, un cryotube de milieu TSA ou LPG avec une colonie isolée de 24 h. Incuber 24 h à $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, puis stocker à minimum $\leq -18^{\circ}\text{C}$.

8 Mode opératoire

Le laboratoire met en place des dispositions adaptées à son environnement (locaux, infrastructures, ...) visant à éviter tout risque de confusion entre échantillons et tout risque de contamination d'un échantillon par un autre.

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

L'échantillon désigne ici la partie prélevée du végétal reçue au laboratoire à partir de laquelle les prises d'essai pour dilacération sont réalisées en vue d'en extraire les bactéries. La prise d'essai se réalise en conditions stériles. Les instruments sont préalablement désinfectés dans de l'alcool (éthanol à 96 % vol) et flambés entre chaque prise d'essai.

- Sélectionner les parties de végétal présentant des symptômes intéressants (cf. figure 1 et <https://gd.eppo.int/taxon/ERWIAM/photos>), les désinfecter superficiellement à l'aide de coton imbibé d'alcool (éthanol à 70% vol);
- Si nécessaire, écorcer le végétal. Par prise d'essai, découper au scalpel un fragment de végétal (environ 1 X 0,5 X 0,2 cm) en bordure de lésion et le placer dans une boîte de Petri stérile.
- Réaliser au moins deux prises d'essai par végétal et plus si nécessaire en fonction des symptômes présents (présence ou pas d'exsudats).
- Ajouter environ 2 mL d'eau de qualité analytique stérile dans la boîte de Petri contenant la prise d'essai,
- Dilacérer finement à l'aide d'un scalpel,
- Laisser macérer environ 10 à 20 minutes à température ambiante

8.2 Isolement

- Réaliser un étalement par épuisement en 3 secteurs à l'aide d'une anse stérile ou étaler un volume d'environ 100 µL sur toute la surface de la boîte de milieu à l'aide d'un étaloir sur au moins une boîte de milieu King B. Le milieu Levane peut être utilisé en doublon. A moins qu'ils soient à usage unique, les instruments sont préalablement désinfectés dans de l'alcool (éthanol à 96% vol) et flambés entre chaque prise d'essai.

Attention : des colonies d'Ea « Levane négatives » ont été observées sur milieu Levane (Bereswill et al, 1997); ce milieu ne doit donc pas être utilisé **seul** mais en complément du milieu King B.

- Mettre à incuber les boîtes de Petri à 25°C au moins 24 heures et jusqu'à 96 heures en fonction de la croissance bactérienne

Lors de l'observation les boîtes, les colonies typiques ont les caractères suivants :

Milieu King B: les colonies d'Ea apparaissent à partir de 24 heures, de couleur blanche, circulaires tendant à s'étaler (culture crémeuse à partir de 48h) et non-fluorescentes (sous UV à 365 nm, culture de 48h).

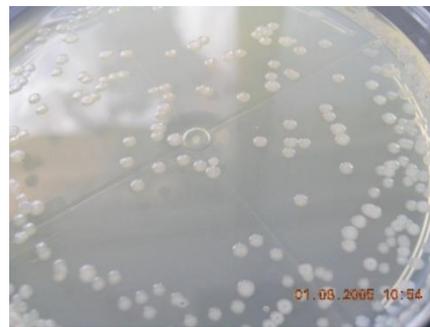


Figure 3 : Colonies d'Ea sur milieu King B
(source Anses LSV)

Milieu Levane : les colonies d'Ea apparaissent à partir de 24 heures et sont blanchâtres, circulaires, très bombées, lisses et muqueuses après 48h.



Figure 4 : Colonies d'Ea sur milieu Levane
(source Anses LSV)

En cas de présence, au moins une colonie typique ou suspecte d'Ea sur au moins une boîte de culture (quel que soit le milieu) doit faire l'objet d'une identification.

Pour disposer de suffisamment de culture bactérienne pour réaliser l'ensemble des tests du point 8.3, repiquer la (ou les) colonie(s) typique(s) ou suspecte(s) sur boîte de milieu King B et mettre en incubation à 25°C au minimum 24h.

8.3 Identification par tests rapides

Pour l'identification, les souches subiront obligatoirement les 5 tests indiqués dans le tableau n°5 et décrits en annexe 2. Ces 5 tests permettent de statuer positivement sur la présence d'Ea, sauf en cas d'isolement de souches issues de *Pyrus pyrifolia* pour lesquelles le test moléculaire décrit au 8.4 est à réaliser obligatoirement. A l'inverse, tout isolat ne répondant pas conformément à l'un de ces 5 tests peut être écarté immédiatement sans subir les autres tests. L'ordre de réalisation des tests est à l'initiative du laboratoire.

Aussi, afin de conforter toute identification d'Ea, ce test moléculaire peut être réalisé systématiquement en plus des 5 tests rapides, mais reste facultatif sur souches issues de plantes autres que *Pyrus pyrifolia*.

8.4 Identification par PCR en temps réel selon Pirc et al., 2009

Pour chaque série d'amplification, réaliser un témoin négatif d'amplification et un témoin positif d'amplification tel que décrit au point 5.5.2.

L'amplification est réalisée sur extraits d'ADN purs à raison de 2 amplifications par extrait.

8.4.1 Extraction de l'ADN

- Suspendre, à l'aide d'une anse d'inoculation stérile, de la culture fraîche de 24h d'une colonie suspecte d'Ea dans un volume d'eau (compris entre 250 µL et 1 mL) de qualité analytique stérilisée, puis agiter vigoureusement pour obtenir une suspension bien homogène à environ $10^6 - 10^7$ Ufc/ml.
- Réaliser la lyse thermique en utilisant un bain thermostaté ou bain à sec à 100°C pendant au moins 5 min, puis placer le microtube à une température $\leq -18^\circ\text{C}$ minimum 10 min.

8.4.2 Amplification selon Pirc et al., 2009

La composition du mélange réactionnel pour une réaction est présentée dans le tableau 3 ci-après :

Tableau 3 : Composition du mélange réactionnel

Réactifs	Concentration finale ou volume final
Eau ultra pure	qsp 8 µL
TaqMan™ Fast Universal Master Mix (2X), no AmpErase™ UNG (Applied Biosystems)	1 X
Amorce Ams116F	0,9 µM
Amorce Ams189R	0,9 µM
Sonde Ams141T	0,2 µM
Extrait d'ADN	2 µL
Volume final	10 µL

Les différents paramètres de l'amplification par PCR en temps réel pour la détection d'Ea sont présentés dans le tableau 4 ci-après:

Tableau 4 : Programme d'amplification

Températures (°C)		Durée	Cycles
Initiation	50	2 min	
Dénaturation initiale	95	10 min	
Dénaturation	95	15 sec	40
Hybridation et élongation	60	1 min	

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 aux tests d'isolement et d'identification sont décrits dans les paragraphes ci-après.

9.1.1. Etape d'isolement

A chaque production de lot de milieu, des contrôles de stérilité et de qualité microbiologique seront vérifiés *a minima* en vérifiant visuellement l'absence de colonies saprophytes/fongiques et en testant la croissance de la souche cible (morphologie de colonies isolées). Ce dernier contrôle sert également de témoin de manipulation. Un témoin peut cependant être réalisé à chaque manipulation.

9.1.2 Résultats attendus pour les tests rapides d'identification

Tableau 5 : Tests rapides d'identification d'*Erwinia amylovora*

Tests rapides	Résultats attendus
Fluorescence sur King B	Négative
Séro-agglutination	Positive
Oxydase	Négative
Gram à la potasse	Filet (Gram négatif)
Hypersensibilité sur tabac	Positive

NB : Tout isolat ne répondant pas conformément à l'un de ces 5 tests peut être écarté immédiatement sans subir les autres tests.

9.1.3 Résultats attendus sur isolat au test PCR Pirc *et al.*, 2009

Une valeur de cycle threshold (Ct) doit être accompagnée d'une courbe de type exponentiel en échelle linéaire et logarithmique pour être prise en compte.

Pour la détermination de la ligne de seuil (threshold), il est recommandé d'utiliser la détermination automatique réalisée avec le logiciel du thermocycleur.

La validation de l'analyse s'effectue en observant les courbes de fluorescence mesurées par l'appareil de PCR en temps réel et générées à partir des différents témoins.

L'analyse est considérée validée si et seulement si l'ensemble des conditions suivantes est réuni en fin de réaction :

- Le témoin négatif d'amplification n'a pas généré de courbe de fluorescence caractéristique, ni de valeur de Ct. Ils permettent de vérifier l'absence de contamination croisée accidentelle.
- Le témoin positif d'amplification a généré une courbe de fluorescence de type exponentielle et une valeur de Ct \leq à 40.

Dans le cas où une ou plusieurs conditions ne seraient pas respectées, l'analyse n'est pas validée.

Si la série d'analyse est validée, les résultats peuvent être considérés comme interprétables.

Les règles d'interprétation des résultats de chaque réplicat sont présentées dans le tableau 6 ci-après :

Tableau 6 : règles applicables pour la cible Ea

Valeur de Ct obtenue pour le réplicat	Statut du réplicat
Ct < 40	Positif
Ct=40	Négatif
Absence de Ct	Négatif

L'interprétation en fonction des résultats des réplicats est présentée dans les tableaux 7 et 8 ci-après :

Tableau 7 : interprétation des résultats du test PCR Ea

Résultat final des 2 réplicats	Action	Interprétation / marche à suivre / Expression des résultats
+/+	Fin	Ea détectée
+/-	Refaire le test	Suite au nouveau test : - si résultat +/+ ou +/- : Ea détectée - si résultat -/- :Ea non détectée
-/-	Fin	Ea non détecté

9.2 Calculs et expression des résultats

Donc, 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 en 7.3.

En absence d'isolement de souche répondant aux critères d'identification d'Ea, l'échantillon est négatif.

Tableau 8 : Interprétation des résultats combinés des tests

Interprétation et expression des résultats	Détection / identification			Expression des résultats
	Isolement sur milieu (x)	Tests rapides	PCR Pirc et al., 2009	
Tous végétaux	Absence de colonies suspectes			<i>Erwinia amylovora</i> non détectée
Tous végétaux sauf <i>Pyrus pyrifolia</i>	Colonies suspectes	Résultats conformes aux résultats attendus pour Ea	(Facultative) POSITIVE	<i>Erwinia amylovora</i> détectée
		Résultats non conformes aux résultats attendus pour Ea		<i>Erwinia amylovora</i> non détectée
<i>Pyrus pyrifolia</i>	Colonies suspectes	Résultats conformes aux résultats attendus pour Ea	POSITIVE	<i>Erwinia amylovora</i> détectée
		Résultats conformes aux résultats attendus pour Ea	NEGATIVE	<i>Erwinia amylovora</i> non détectée Contacter le LNR
		Résultats non conformes aux résultats attendus pour Ea		<i>Erwinia amylovora</i> non détectée

Expression des résultats sur le rapport d'analyse

Le résultat final est exprimé sous forme qualitative : « négatif / positif », « détectée / non détectée » ou mention équivalente.

10 Caractéristiques de performance de la méthode

La présente version de méthode est une révision de la méthode BL/05/07 version a. La méthode par isolement sur milieux à partir de végétal symptomatique n'ayant pas été modifiée, les critères de performance de celle-ci n'ont pas été réévalués.

10.1 Tests rapides d'identification

La modification du nombre de tests d'identification rapide se base sur un rapport (Anses, 2013) reprenant :

- Les conclusions d'une étude comparative de 2005 sur 17 souches des 5 tests retenus dans la présente méthode avec l'ensemble des 13 tests décrits dans la version a de la BL/05/07.
- La vérification par PCR Pirc *et al.* 2009 (cible Ams) de la fiabilité de l'identité préalablement déterminée par tests rapides sur 63 souches isolées entre 1994 et 2016

et sur une étude de confirmation d'identité sur 78 souches de la collection interne du LNR, isolées entre 1991 et 1994 d'échantillons d'origine française (à l'exception d'une provenant des Pays-Bas) (Anses, 2021)

10.2 Identification par la PCR en temps réel, Pirc *et al.* (2009)

La PCR en temps réel Pirc *et al.* (2009) a été évaluée en terme d'inclusivité, d'exclusivité et de répétabilité. La sensibilité analytique (seuil de détection) n'a pas d'intérêt dans le cas d'un test utilisé uniquement en identification de souches et non sur végétal. La synthèse des caractéristiques de performance de la PCR en temps réel, Pirc *et al.* (2009) présentée dans le tableau ci-après est extraite du rapport de validation établi par le LNR en juin 2024.

Tableau 9 : Spécificité analytique (inclusivité et exclusivité) de la PCR Pirc et al., 2019 cible (Ams)

Critères de performance	Paramètre	Valeur ou résultat obtenu lors de la caractérisation	Principales informations relatives aux modalités de réalisation de la caractérisation
Inclusivité	Pourcentage de souches détectées parmi une gamme de souche cibles	100%	<p>18 souches cibles de collection testées en 2012-2013 (Anses, 2013)</p> <p>60 souches isolées d'échantillons de feu bactérien datant de 2013 (24), 2014 (12), 2015 (3), 2016 (6) et 2017 (15),</p> <p>78 souches isolées entre 1991 et 1994 d'échantillons de feu bactérien (collection GRISP, LNPV, LSV) (Anses, 2021)</p> <p>Soit un total de 156 souches cible testées</p>
Exclusivité	Pourcentage de souches non détectées parmi une gamme de souche non-cibles	100%	<p>13 souches non cibles de collection LSV testées en 2012 (Anses, 2013)</p> <p>28 non cibles / isolats saprophytes (22 en 2014, 2 en 2016 et 4 en 2024)</p> <p>Soit un total de 41 souches non cibles testées issues de matrices végétales diverses.</p>
Répétabilité	Pourcentage d'accords entre répliqués	100%	<p>Accords entre duplicats sur 78 souches (Anses, 2021) et triplicats sur 20 souches cibles (1959 à 2017)</p> <p>Accords entre triplicats sur 19 souches non cibles (1954 à 2016)</p> <p>(Anses, 2013 ; 2016 ; 2024)</p>

Annexe 1 : Milieux de culture et tampon

Bonnes pratiques:

- Mettre en place un suivi métrologique de la balance et du pH-mètre,
- Peser chaque produit dans une coupelle jetable et tracer au fur et à mesure les masses pesées,
- Introduire les produits pesés dans un récipient adéquat,
- Rincer la spatule à l'eau de qualité analytique ou à l'éthanol à 96% vol puis la sécher entre chaque produit,
- Ajouter la quantité d'eau de qualité analytique nécessaire,
- Homogénéiser à l'aide d'un agitateur magnétique,
- Contrôler le pH si indiqué.

Les milieux de culture ou milieux utilisés pour réaliser des tests biochimiques sont des réactifs critiques. 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. Le contrôle de qualité microbiologique sera vérifié *a minima* en testant la bonne croissance de la souche cible et le contrôle de la fluorescence sur milieu King B. Ce contrôle sert également de témoin de manipulation.

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 permettant de prolonger son utilisation. Le stockage des milieux doit être maintenu au frais (exemple : à 5°C) et 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 les milieux concernés.

Pour les solutions et tampons, un contrôle visuel de la stérilité est, *a minima*, mis en œuvre.

Milieu King B

Nom produit	Quantité	Unité
protéose peptone n°3	20,0	g
glycérine bidistillée (Glycérol)	10,0	g/mL
potassium phosphate, dibasique (K ₂ HPO ₄)	1,5	g
sulfate de magnésium (MgSO ₄ , 7H ₂ O)	1,5	g
agar bactériologique de type A	15,0	g
eau déminéralisée	1000	mL

Commentaires	<ul style="list-style-type: none"> -autoclaver à environ 121°C pendant 20 min. -dissoudre stérilement 50 mg de cycloheximide (soluble dans l'éthanol) -après autoclavage, l'ajouter stérilement au milieu en prenant toutes les précautions d'hygiène nécessaires afin d'éviter toutes contaminations. -couler en boîtes de Petri Ø 90 mm
--------------	---

Milieu Levane

Nom produit	Quantité	Unité
extrait de levure (yeast extract)	2,0	g
peptone	5,0	g
D(+) saccharose	50,0	g
chlorure de sodium (NaCl)	5,0	g
agar bactériologique de type A	20,0	g
eau déminéralisée	1000	mL
pH	7,2	

Commentaires	<ul style="list-style-type: none"> - autoclaver à environ 121°C pendant 20 min - dissoudre stérilement 50 mg de cycloheximide (soluble dans l'éthanol) - après autoclavage, l'ajouter stérilement au milieu en prenant toutes les précautions d'hygiène nécessaires afin d'éviter toutes contaminations. - couler en boîtes de Petri Ø 90 mm
--------------	--

Tampon PBS

Nom produit	Quantité	Unité
chlorure de sodium (NaCl)	8,0	g
hydrogénophosphate de disodium (Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O)	2,7	g
dihydrogénophosphate de sodium (NaH ₂ PO ₄ , 2 H ₂ O)	0,40	g
eau déminéralisée	1000	mL
pH	7,2	

Commentaires	<p>Il est possible d'autoclaver à environ 121°C pendant 20 min. Dans ce cas, les flacons stérilisés et bouchés peuvent alors être conservés pendant 6 mois. Les flacons stérilisés doivent être utilisés dans les 30 jours suivant leur ouverture.</p> <p>Les flacons non autoclavés seront à utiliser dans un délai de 30 jours.</p>
--------------	---

Milieu de conservation de souches à long terme :

Le milieu LPG est donné à titre d'exemple, d'autres milieux reconnus comme le TSA peuvent également être utilisés.

Milieu LPG

Nom produit	Quantité	Unité
extrait de levure (yeast extract)	5,0	g
peptone	5,0	g
glycérine bidistillée (glycérol)	150	mL
eau déminéralisée	1000	mL

Commentaires	<ul style="list-style-type: none"> - Bien homogénéiser le milieu avant de distribuer en flacon de 100 mL - autoclaver à environ 121°C pendant 20 min - stocker à 4°C ± 3°C - Prévoir de mettre le flacon à température ambiante 2 à 3 jours avant utilisation <p>Avant utilisation, <u>vérifier l'absence de trouble dans le flacon.</u></p>
--------------	--

Annexe 2 : Modes opératoires des tests rapides

1. Test à la potasse, indicateur du GRAM (Suslow et al., 1982)

La technique du test KOH 3% (Suslow et al., 1982) est basée sur la solubilité de la paroi des bactéries dans la potasse qui contribue à la libération d'ADN. Il s'agit d'un test rapide et peu coûteux ayant une bonne corrélation avec la technique de coloration de Gram. Ce test est également nommé "Gram à la potasse" ou encore "test KOH".

- Déposer une goutte de solution aqueuse de KOH à 3% (poids/volume) sur une lame de microscopie. A l'aide d'une anse, émulsionner dans la goutte de KOH la culture (âgée d'environ 24 heures) repiquée d'une colonie sur milieu solide.

Ne pas mettre une trop grande quantité de culture pour éviter la formation d'un filament élastique « artificiel ».

Lecture immédiate :

- Formation d'un filament élastique en soulevant l'anse : le test est considéré positif, la bactérie est Gram négatif.
- Absence de formation de filament, la culture se détache bien de la goutte : le test est considéré négatif, la bactérie est Gram positive.

2. Test de mise en évidence de l'activité cytochrome C oxydase (Klement et al., 1990)

La cytochrome c oxydase est une enzyme que possèdent certaines bactéries. On révèle sa présence avec le N,N diméthyl paraphénylène diamine ou le N,N diméthyl paraphénylène diamine dihydrochloride. Ces deux réactifs sont capables d'être oxydés en un produit de couleur violet pourpre ou bleu pourpre.

- à l'aide d'une anse, prélever de la culture bactérienne âgée d'environ 24 heures.
- émulsionner la culture sur la bandelette pré-imprégné de réactif (par exemple : Bactident oxydase[®]-VWR[®]).

Lecture immédiate (10 à 30 secondes) : coloration rose-violette : bactérie oxydase +
absence de coloration : bactérie oxydase -

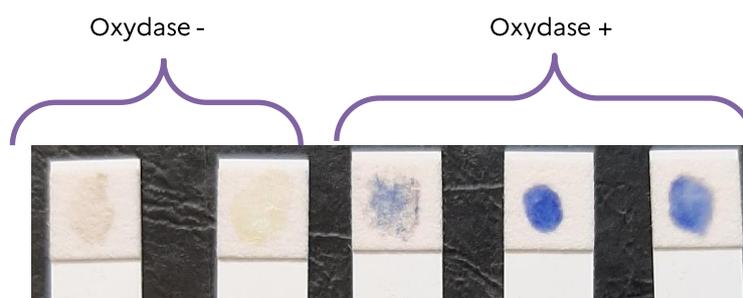


Figure 5: Lecture du test oxydase (source Anses LSV)

Il est important de réaliser ce test sur des colonies âgées d'environ 24h. De faux négatifs peuvent être observés avec des colonies trop âgées.

3. Test de fluorescence sur King B (Schaad et al., 2001)

Certains *Pseudomonas* produisent des pigments fluorescents (pyoverdine) sur des milieux particuliers contenant une teneur élevée en phosphate et faible en fer. Ces pigments sont hydrosolubles et diffusent dans le milieu, gris vert, fluorescents aux rayons proches de l'Ultra-Violet (UV). Le milieu utilisé pour ce test est le milieu King B (King et al., 1954).

A partir de l'isolat repiqué et mis en culture sur King B, la lecture est immédiate après 24 à 48 h d'incubation (lecture en pièce noire):

- Diffusion d'une coloration vert-bleu visible à l'œil nu confirmée par l'examen d'une fluorescence sous la lampe de Wood (longueur d'onde 365 nm): le résultat est positif (fluorescence +)
- Absence de fluorescence sous la lampe à UV : le résultat est négatif (fluorescence -)

4. Test d'hypersensibilité sur tabac (HST) (Schaad *et al.*, 2001)

Le test d'hypersensibilité (HR) est une réaction de défense rapide de la plante contre la présence d'un agent pathogène. Ce test sert à mettre en évidence le pouvoir pathogène d'une bactérie par le dessèchement des zones d'inoculation sur les feuilles de tabac.

A partir d'une culture bactérienne âgée d'environ 24h, préparer en zone stérile, avec de l'eau stérile de qualité analytique, une suspension dense à une concentration d'environ 10^8 ufc/mL

- Percer délicatement la feuille d'un tabac à l'aide d'une pointe de crayon ou pointe d'une aiguille
- Infiltrer la suspension dense dans le limbe foliaire, à l'aide d'une seringue stérile jetable hypodermique sans aiguille, en plaçant l'index sous la feuille et l'embout de la seringue
- Noter la référence de la souche près de la zone inoculée

L'injection de la suspension bactérienne est visible sur la face inférieure de la feuille.

Lecture : à partir de 24 heures après infiltration

- Apparition d'une nécrose du parenchyme et d'un dessèchement au niveau de la zone infiltrée : la bactérie présente une réaction positive au test d'hypersensibilité (HR +). Une réponse de la plante au-delà de 3 jours ne signifie pas que la bactérie est hypersensible.
- Aucune réaction : la bactérie présente une réaction négative au test d'hypersensibilité (HR -)
- Flétrissement général du plant : l'agent inoculé est pathogène du tabac, le test de pouvoir pathogène est positif.



Figure 6: Lecture du test HST (source Anses LSV)

5. Test de séro-agglutination (OEPP, 2022)

Ce test est rapide et simple pour l'identification sérologique de souche bactérienne. En présence de la bactérie contre laquelle l'antisérum est dirigé, une agglutination s'opère entre :

- ① les antigènes présents à la surface des cellules bactériennes et des flagelles,
- ② et les anticorps spécifiques.

Une solution d'antisérum dilué entre 5 et 10% est préparée dans un tampon PBS (annexe 1) et préalablement contrôlée à l'aide d'une souche de référence (par exemple, la souche issue de la collection CFBP : CFBP1430). La qualification de l'antisérum pour utilisation en séro-agglutination est basée sur ses performances de spécificité analytique en immunofluorescence.

A l'aide d'une anse, émulsionner la culture bactérienne dans une goutte de solution d'antisérum spécifique d'Ea sur une lame de microscopie en verre. L'observation visuelle d'un précipité atteste d'un résultat positif. L'émulsion reste homogène dans les cas négatifs.

Bibliographie

- (2022) PM 7/20 (3) *Erwinia amylovora*. *EPPO Bulletin*. 52, 198–224.
- Anses (2013). Evaluation de l'impact de la modification du protocole d'identification d'*Erwinia amylovora* – version 2 du 04/04/2013. Anses LSV Angers. 4 pages.
- Anses (2021). Rénovation de la collection de souches bactériennes phytopathogènes du LSV. Rapport d'apprentissage d'Eloïse Trouvé de Licence Professionnelle – Biologie Analytique et Expérimentale, parcours végétal IUT/université d'Angers. Anses LSV Angers. 89 pages.
- Anses (2024). Rapport de caractérisation et de validation d'une méthode d'analyse : Identification d'isolats bactériens d'*Erwinia amylovora* par PCR en temps réel selon Pirc *et al.*, 2009. Anses LSV Angers. 26 pages.
- Bereswill S, Jock S, Aldridge P, Janse JD & Geider K (1997) Molecular characterization of natural *Erwinia amylovora* strains deficient in levan synthesis. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 51, 215–225.
- Kim WS, Gardan L, Rhim SL & Geider K (1999) *Erwinia pyrifoliae* sp., a novel pathogen that affects Asian pear trees (*Pyrus pyrifolia*). *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 899–906.
- Kim WS, Hildebrand M, Jock S & Geider K (2001) Molecular comparison of pathogenic bacteria from pear trees in Japan and the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Microbiology* 147, 2951–2959.
- Kim WS, Jock S, Rhim SL & Geider K (2001) Molecular detection and differentiation of *Erwinia pyrifoliae* and host range analysis of the Asian pear pathogen. *Plant Disease* 85, 1183–1188
- Klement, Z., Rudolph, K. & Sands, D.C. (1990) *Methods in phytobacteriology*. Akademiai Kiad Budapest (HG). 568p.
- López MM, Roselló MM, Llop P, Ferrer S, Christen R & Gardan L (2011) *Erwinia piriflorinigrans* sp. nov. a novel pathogen that causes necrosis of pear blossoms. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61, 561–567.
- Pirc M., Ravnkar M., Tomlinson J., Dreo T. (2009) Improved fireblight diagnostics using quantitative real-time PCR detection of *Erwinia amylovora* chromosomal DNA. *Plant Pathology* 58, 872–881.
- Schaad, N. W., Jones, J. B. & Chun, W. (2001) *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. APS Press. Third edition St Paul, Minnesota (US). 373p.
- Suslow, T.V., Schroth, M.N. & Tsaka M. (1982) Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology* 72, 917–918