

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV MA 044 - Version 4

Consultation

Détection du Banana streak virus (BSV) sur bananier, espèces Obino l'Ewaiï, Goldfinger, Imové et Mysore par PCR conventionnelle multiplexe

(Protocole par immunocapture pour tous les génomes de bananier
ou par extraction d'ADN pour les bananiers de génome A)

Laboratoire de la santé des végétaux

Laboratoire national de référence « Virus sur bananier et plantes tropicales »

Historique de la méthode

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

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

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

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

Tableau 1: Historique des versions de la méthode.

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
v1*	Sans objet	Janvier 2017	Version initiale
v2	Majeure	Septembre 2017	Validation d'une nouvelle référence d'anticorps de coating BSV suite à l'arrêt de la commercialisation de l'anticorps de coating NEOGEN. Au paragraphe 5.2, il a été rajouté la possibilité d'utiliser l'anticorps produit et commercialisé aux Etats-Unis par AC Diagnostics et distribué en France par la société Sediag. Cet anticorps de coating BSV a été validé et peut être utilisé en remplacement (Voir rapport de validation PJ-BSV01-2016 additif 2017)
V3	Majeure	Avril 2021	L'arrêt de commercialisation des anticorps nécessaires à la méthode d'IC PCR de la version 2, conduit à prévoir 2 méthodes d'extraction des acides nucléiques différentes selon le génome du bananier : (i) Génome A : une extraction basée sur un kit commercial (ii) Génome contenant du B : conservation d'une étape d'immunocapture
V4**	Majeure	Août 2022	La validation de nouveaux anticorps permet de revenir à la méthode d'extraction du virus cible par immunocapture pour tous les génomes de bananier tout en gardant la possibilité d'une extraction des acides nucléiques basée sur un kit commercial pour les bananiers de génome A, notamment si une nouvelle rupture d'approvisionnement en anticorps validés se produisait ou dans des situations de multidétection d'organismes pathogènes du bananier impliquant une étape commune d'extraction d'ADN (exemple : détection couplée du BSV et du Banana bunchy top virus sur les mêmes échantillons de bananier de génome A).

* La version 1 a fait l'objet d'une consultation du public du 14 octobre au 14 décembre 2016 sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.

** La version 4 a fait l'objet d'une consultation du public du 03 août au 15 septembre 2022 sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.

Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

Anses - Laboratoire de la santé des végétaux - Unité « Ravageurs et pathogènes tropicaux » (RAPT)

Laboratoire National de Référence (LNR) pour la détection des virus du bananier et des plantes tropicales

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

Contact : saint-pierre.lsv@anses.fr

Les travaux méthodologiques effectués sur la méthode ont donné lieu à plusieurs rapports de validation (PJ-BSV01-2016, PJ-BSV01-2016-additif 2017, PJ-BSV01-2021, PJ-BSV01-2022).

Sommaire

Avant-propos	3
Introduction	7
Avertissements et précautions de sécurité	8
1. Objet et domaine d'application	9
2. Documents de référence	9
3. Termes, sigles et définitions	9
4. Principe de la méthode	10
5. Réactifs	12
5.1 Eau.....	12
5.2 Réactifs sérologiques	12
5.3 Réactifs PCR.....	12
5.3.1 Kit d'extraction d'ADN	13
5.3.2 Master mix	13
5.3.3 Oligonucléotides	13
5.4 Tampons	13
5.5 Autres réactifs et consommables.....	14
5.6 Contrôles et témoins.....	14
6. Appareillage et matériels	16
6.1 Broyeur.....	17
6.2 Thermocycleur pour PCR point final	17
7. Échantillons	17
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	17
7.2 Conservation des échantillons avant analyse	18
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse.....	18
8. Mode opératoire	19
8.1 Préparation des échantillons pour analyse	19
8.2 Broyage des échantillons.....	19
8.3 Extraction et mélange réactionnel pour la PCR multiplexe.....	20
8.3.1. Tous les génomes (génomme A et génomme B) : Immunocapture.....	20
8.3.1.1 Coating.....	20

8.3.1.2 Clarifications des extraits.....	20
8.3.1.3 Lavage	20
8.3.1.4 dépôt des échantillons	20
8.3.1.5 Lavage	21
8.3.2 Tous les génomes (génom A et génome B) : PCR conventionnelle multiplexe (mélange réactionnel).....	21
8.3.3. Génome A exclusivement : Extraction d'ADN.....	22
8.3.4 Génome A exclusivement : PCR conventionnelle multiplexe (mélange réactionnel).....	23
8.4 Amplification et Électrophorèse	24
8.4.1. Programme du thermocycleur	24
8.4.2 Électrophorèse et Révélation	25
9. Résultats	26
9.1 Contrôle de la validité des résultats	26
9.2 Calculs et expression des résultats	28
10. Caractéristiques de performance de la méthode.....	30
Annexe 1.....	32
Bibliographie.....	33

Table des figures

FIGURE 1 : PRINCIPE DE LA DETECTION DU BSV	11
--	----

Table des tableaux

TABLEAU 1: HISTORIQUE DES VERSIONS DE LA METHODE.	2
TABLEAU 2 : SEQUENCES DES AMORCES.....	13
TABLEAU 3: EMT PAR GRANDEUR	17
TABLEAU 4 : CONCENTRATION DES SOLUTIONS D'AMORCES.....	21
TABLEAU 5 : MELANGE REACTIONNEL POUR LA PCR (TOUS LES GENOMES).....	22
TABLEAU 6 : CONCENTRATION DE CHAQUE AMORCE PAR PUIITS PCR.....	22
TABLEAU 7 : CONCENTRATION DES SOLUTIONS D'AMORCES.....	23
TABLEAU 8 : MELANGE REACTIONNEL POUR LA PCR (GENOME A).....	24
TABLEAU 9 : CONCENTRATION DE CHAQUE AMORCE PAR PUIITS PCR.....	24
TABLEAU 10 : PROGRAMME D'AMPLIFICATION.....	24
TABLEAU 11 : RESULTATS ATTENDUS POUR LES DIFFERENTS TEMOINS UTILISES POUR LE PROTOCOLE AVEC EXTRACTION PAR IMMUNOCAPTURE (TOUS LES GENOMES DE BANANIERS).....	26
TABLEAU 12 : RESULTATS ATTENDUS POUR LES DIFFERENTS TEMOINS UTILISES POUR LE PROTOCOLE AVEC EXTRACTION D'ADN PAR KIT COMMERCIAL (GENOME A EXCLUSIVEMENT).....	27
TABLEAU 13 : INTERPRETATION DES RESULTATS DES ECHANTILLONS.....	28
TABLEAU 14 : SYNTHESE DES CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE DE DETECTION DU BSV PAR IC-PCR MULTIPLEXE SUR BANANIER (GENOME A ET GENOME B).....	30
TABLEAU 15 : SYNTHESE DES CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE DE DETECTION DU BSV PAR PCR MULTIPLEXE SUR LES BANANIERS DE GENOME A.....	31

Introduction

Le Banana streak virus (BSV) est responsable de mosaïques en tirets chlorotiques sur bananier. Les symptômes évoluent en nécroses et conduisent à un éclatement du pseudo-tronc. Dans des cas sévères, l'infection peut aboutir à la mort des plants par nécrose du méristème apical empêchant la formation de l'inflorescence. Le BSV est un complexe d'espèces : il existe entre ses isolats une forte hétérogénéité, tant sérologique que génétique, qui se traduit par une classification en diverses espèces virales selon les critères de l'ICTV (King et al. 2012).

Le banana streak virus appartient à la famille *Caulimoviridae* et au genre *Badnavirus*. L'originalité du BSV réside principalement dans l'existence de deux formes virales conduisant à une infection :

- La forme épismale, issue de la multiplication virale dans les cellules végétales, suite à l'infection d'un bananier par une cochenille vectrice.
- La forme eBSV qui est endogène au génome de l'espèce *Musa balbisiana* (génom B) sous forme de séquences virales linéaires et le plus souvent « dormante » dans les bananiers. Suite à des stress abiotiques (comme un stress hydrique ou la micro-propagation *in vitro*), ces formes intégrées vont pouvoir libérer des génomes viraux fonctionnels dans les cellules du bananier. Ces eBSV sont alors nommés eBSV infectieux.

La présente méthode, en intégrant les contrôles *ad hoc*, détecte toutes les formes libres infectieuses. La détection de formes intégrées doit être considérée comme de l'accrochage aspécifique et assimilée à des faux positifs.

La méthode décrite dans ce document permet de détecter spécifiquement 4 espèces de BSV : l'espèce Obino l'Ewaï (BSOLV), l'espèce Goldfinger (BSGFV), l'espèce Imové (BSIMV) et l'espèce Mysore (BSMYV) selon une méthode de PCR conventionnelle dont l'amplification génique cible des séquences spécifiques de chaque espèce de BSV (Geering et al, 2000 et 2011) et un marqueur interne d'amplification du génome de plante nommé AGMI (Lagoda et al, 1998). L'étape d'extraction du virus cible peut différer selon le génome des bananiers :

- (i) Pour tous les bananiers (bananiers de génome A et bananiers contenant du génome B) : une phase d'extraction basée sur une étape d'immunocapture peut être réalisée à l'aide d'anticorps validés. De nouveaux anticorps ont récemment pu être validés (Rapport complémentaire de validation PJ-BSV01-2022)
- (ii) Pour les bananiers de génome A : l'extraction en ayant recours à un kit commercial d'extraction d'acides nucléiques peut être réalisée, **notamment lorsque le client a la connaissance de la nature du génome A du bananier et en informe le laboratoire et**, en particulier dans les situations de rupture d'approvisionnement en anticorps validés, ne permettant pas la mise en œuvre de l'immunocapture, ou dans des situations de multidétection d'organismes pathogènes du bananier impliquant une étape commune d'extraction d'ADN (exemple : détection couplée du BSV et du Banana bunchy top virus sur les mêmes échantillons de bananier de génome A). L'étape d'extraction d'acides nucléiques en ayant recours à un kit commercial a fait l'objet d'une validation (Rapport de validation PJ-BSV01-2021).

La méthode décrite dans le document est directement liée aux méthodes d'analyse MOA008 « Techniques ELISA » et MOA 022 « Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques » : elle ne peut être appliquée qu'en respectant les préconisations de ces méthodes.

Avertissements et précautions de sécurité

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

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

Certains produits utilisés dans cette méthode peuvent présenter un risque pour l'opérateur et/ou pour l'environnement. Il convient de suivre les recommandations du fournisseur pour l'utilisation de ces produits et l'élimination des déchets et de se référer aux fiches de données de sécurité en vigueur.

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) doit être détruit par autoclavage ou autre moyen inactivant les virus.

Les consommables ayant été en contact avec le matériel végétal infecté (ou de statut indéterminé) doivent être détruits par autoclavage ou autre moyen inactivant les virus.

Le matériel ayant été en contact avec le végétal infecté (ou de statut indéterminé) doit être désinfecté.

1. Objet et domaine d'application

La méthode permet de détecter la présence des 4 espèces principales de BSV :

- Sur tout bananier (bananier de génome A et bananier contenant du génome B), par la technique d'immunocapture (IC) PCR conventionnelle multiplexe.
- Sur bananier de génome A par la technique de PCR conventionnelle multiplexe : cette alternative est possible en cas de rupture d'approvisionnement en anticorps validés, ne rendant pas possible la phase d'immunocapture, et uniquement si le client a connaissance de la nature du génome A du bananier et si cette information est transmise explicitement au laboratoire.

La méthode s'applique sur feuilles de bananiers, fraîches ou déshydratées, symptomatiques ou asymptomatiques.

2. Documents de référence

- [1] MOA 022 : Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques : PCR (Polymerase Chain Reaction), RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) et PCR temps réel. Détection et identification des organismes phytopathogènes
- [2] MOA 008 : « Technique ELISA Bactériologie/Virologie »
- [3] Rapport d'évaluation PJ-BSV01-Sept_2016 : « Détection des 4 espèces principales du Banana streak virus (BSV) sur bananier par IC-PCR multiplexe »
- [4] Rapport d'évaluation PJ-BSV01-2016-additif-Mai_2017 : « Détection des 4 espèces principales du Banana streak virus (BSV) sur bananier par IC-PCR multiplexe avec l'anticorps de coating BSV distribué par Sediag »
- [5] Rapport de validation PJ-BSV01-2021 des modification apportées - extraction d'ADN sur bananiers de génome A - à la MA044 version 2.
- [6] Rapport complémentaire de validation PJ-BSV01-2022 : Validation d'un nouveau réactif sérologique pour la phase d'immunocapture pour la détection des 4 espèces de BSV par IC-PCR multiplexe (ANSES/LSV MA 044 version 4)

3. Termes, sigles et définitions

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

4. Principe de la méthode

La technique multiplexe d'amplification génique est une amplification enzymatique des séquences spécifiques des 4 espèces de BSV (Geering et al, 2000 et 2011) et d'un marqueur interne d'amplification du génome de plante nommé AGMI (Lagoda et al, 1998).

La technique d'extraction peut différer selon la nature du génome du bananier.

Il s'agit d'une méthode qualitative donnant une réponse présence / absence de l'organisme cible recherché dans une quantité d'échantillon donnée. Dans certains cas, une réponse indéterminée peut être obtenue.

Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme indemnes de la maladie ou contaminés à un niveau trop faible pour que le virus cible puisse être mis en évidence par la méthode. Les échantillons pour lesquels une réponse positive est obtenue sont considérés comme contaminés. Les échantillons pour lesquels des résultats indéterminés sont obtenus (très faible bande détectée sur gel) sont des échantillons pour lesquels le seuil de détection de la technique ne permet pas de statuer sur la présence ou non du virus.

Le principe de la méthode est présenté dans le schéma de la figure 1 :

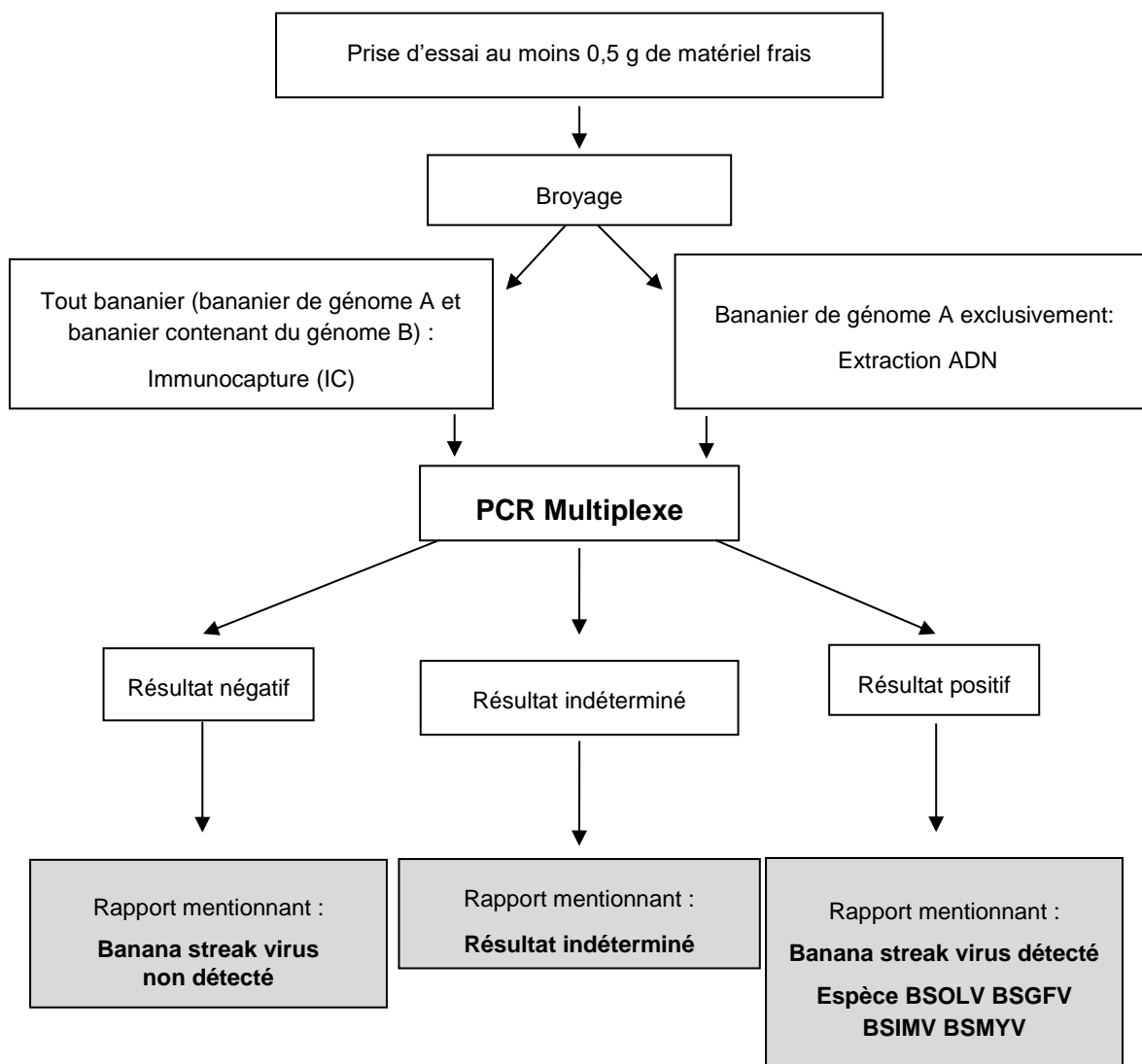


Figure 1 : Principe de la détection du BSV

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.

Les recommandations des fournisseurs, concernant les conditions de stockage et de conservation seront suivies. A défaut le laboratoire définira les conditions qu'il jugera satisfaisantes.

5.1 Eau

L'eau 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 amplifiats) doit présenter une qualité suffisante pour une utilisation en biologie moléculaire (eau ultra-pure).

5.2 Réactifs sérologiques

Le laboratoire utilisera des réactifs sérologiques spécifiques du BSV.

La présente méthode a été caractérisée et validée avec les réactifs sérologiques suivants, qui ont donné des résultats équivalents :

- Anticorps de coating BSV de NEOGEN,
- Anticorps de coating BSV de AC Diagnostics (distribué en France par la société Sediag),
- Anticorps de coating BSOLV de AGDIA.

Les références aux numéros de lots utilisés sont données avec le tableau de synthèse des caractéristiques de performance de la méthode (tableau 14).

En cas de non disponibilité de ces réactifs, les laboratoires doivent se rapprocher du LNR pour s'informer des réactifs sérologiques disponibles et validés.

Les réactifs sérologiques sont des réactifs critiques. Ils doivent faire l'objet de contrôles avant (ou parallèlement à) leur première utilisation conformément aux préconisations de la MOA 008.

5.3 Réactifs PCR

Certains réactifs sont critiques et conditionnent la performance de l'amplification (mastermix ou core kit commercial de polymérase thermostable, dNTP, amorces, eau de qualité ultrapure).

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

5.3.1 Kit d'extraction d'ADN

Le protocole d'extraction d'ADN pour les bananiers de génome A a été caractérisé et validé à l'aide du kit DNeasy® Plant mini kit de Qiagen, en suivant le protocole d'extraction et de purification de l'ADN total « 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... »

5.3.2 Master mix

Les tests de PCR conventionnelles ont été caractérisés et validés avec le mélange réactionnel du kit Gotaq® G2 Hot Start Polymérase (Promega). Les validations ont été réalisées avec le tampon de master mix contenant le tampon de charge.

5.3.3 Oligonucléotides

Les amorces pour la détection des 4 espèces de BSV et du marqueur interne plante, sont les suivantes :

Tableau 2 : Séquences des amorces

Cible	Couples d'Amorces	Nombre de paires de bases attendu (en pb)
Espèce Imové ^(a)	Im R/ CAC CCA GAC TTT TCT TTC TAG C Im F/ TGC CAA CGA ATA CTA CAT CAA C	384
Espèce Mysore ^(b)	Mys F / TAA AAG CAC AGC TCA GAA CAA ACC Mys R / CTC CGT GAT TTC TTC GTG GTC	589
Espèce Gold Finger ^(b)	Gf R / TCG GTG GAA TAG TCC TGA GTC TTC Gf F/ ACG AAC TAT CAC GAC TTG TTC AAG C	476
Espèce Obino l'ewai ^(b)	OI R/ GCT CAC TCC GCA TCT TAT CAG TC OI F/ ATC TGA AGG TGT GTT GAT CAA TGC	522
Amorces microsatellites ^(c) (contrôle ADN plante)	AGMI025 / TTAAAGGTGGGTTAGCATTAGG AGMI026 / TTTGATGTCACAATGGTGTCC	248 (cavendish AAA) /252 (<i>M. balbisiana</i> BB)

^(a) Publié dans Geering et al. (2011)

^(b) Publié dans Geering et al. (2000)

^(c) Publié dans Lagoda et al. (1998)

5.4 Tampons

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

- tampon de broyage type General Extraction Buffer (composition en annexe 1) ;
- tampon de coating ou tampon carbonate ;
- tampon de lavage type PBS-T 1X ;
- tampon de migration (par exemple, TBE 1X ou TAE 1X) ;
- tampon de charge

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 jugera optimales.

5.5 Autres réactifs et consommables

Parmi les consommables spécifiques, il faut utiliser des consommables exempts de RNase et DNase.

- Microcônes stériles avec et sans filtre de volume adaptés
- Microtubes stériles de volume adaptés
- Microtubes, barrettes ou pour plus de facilité de manipulation, des plaques stériles pour PCR de volume adapté au thermocycleur utilisé
- Sachets de broyage avec filtre

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

Afin de s'assurer de détecter uniquement des particules virales, la technique de détection par IC-PCR multiplexe utilise un contrôle interne d'amplification du génome de plante, via des amorces microsattellites, qui permettent de vérifier l'absence d'accrochage aspécifique.

Des échantillons de référence doivent être inclus au cours du processus analytique pour valider les différentes étapes de la méthode. Conformément aux exigences de la méthode officielle d'analyse MOA 022, ces références sont constituées :

Des contrôles pour le protocole avec extraction par immunocapture (protocole applicable à tous les bananiers : les bananiers de génome A et les bananiers contenant du génome B) :

- Un contrôle négatif de processus (T -) : matrice ne contenant pas l'organisme cible, traitée dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser. Doit être déclaré non contaminé à l'issue de la manipulation.
- Un contrôle positif de processus (T +) : matrice contenant l'organisme cible, traitée dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser. Ce contrôle doit être déclaré contaminé à l'issue de la manipulation (tissu de bananier infecté). Ce contrôle donne au minimum l'assurance d'un déroulement correct de la manipulation. Pour chaque série d'analyses, il est possible d'utiliser des échantillons végétaux contaminés (si possible *Musa spp*) préparés au laboratoire (échantillons de référence naturellement contaminés) ou des témoins commerciaux positifs (lyophilisés, glycérolés...) à préparer selon les recommandations du fournisseur. Il est recommandé d'utiliser au minimum un contrôle positif processus de 2 espèces de BSV différentes sur les 4 détectées. Des témoins positifs pour BSOLV et BSMYV sont disponibles dans le commerce (fournisseur DSMZ). Le laboratoire pourra également se constituer une collection de témoins de référence pour les utiliser ultérieurement.

- Pour l'étape d'extraction par Immunocapture, un contrôle « absence d'accrochage aspécifique » : il est fortement recommandé d'utiliser au moins le cultivar *Pisang Klutuk Wulung* (PKW), sans virus episomaux et qui possède les 4 espèces de BSV intégrées dans son génome. Ce témoin sera traité dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser et doit être déclaré non contaminé à l'issue de la manipulation. Ce contrôle valide l'absence d'accrochage aspécifique. Si des bandes apparaissent l'analyse ne sera pas validée.
- Un contrôle positif d'amplification (A+) : solution d'acide nucléique cible, extraite au préalable, introduite à l'étape d'amplification et devant produire un résultat positif à l'issue de la manipulation. Ceci garantissant la qualité de la manipulation pendant la phase d'amplification génique ainsi que le bon fonctionnement du matériel. Il est recommandé d'utiliser l'ADN de bananier infecté par au moins 2 des espèces de BSV. Il pourra **éventuellement** être complété par de l'ADN de PKW. Le PKW est un bananier sauvage *M. balbisiana* cv. Pisang Klutuk Wulung, qui contient les quatre espèces de BSV ; il pourra être fournis par le laboratoire de référence si nécessaire. Ce contrôle nécessite au préalable de réaliser une extraction d'ADN via par exemple un kit commercial.
- Un contrôle 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 PCR. Il pourra **éventuellement** être complété par de l'ADN non cible **génom A**, extrait au préalable, introduit à l'étape d'amplification et devant produire un résultat négatif à l'issue de la manipulation.

Remarque : la présence d'une bande d'amplification des amorces microsatellites sur les contrôles processus indiquera un accrochage aspécifique des amorces sur le génome de la plante et donc la présence potentielle de faux positifs. Ceci peut être expliqué par exemple par un mauvais rinçage de la plaque et entraînera de recommencer le test.

Des contrôles pour le protocole avec extraction d'ADN par kit commercial (protocole applicable uniquement aux bananiers de génome A):

- Un contrôle négatif de processus (T -) : matrice ne contenant pas l'organisme cible, traitée dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser. Doit être déclaré non contaminé à l'issue de la manipulation.
- Un contrôle positif de processus (T +) : matrice contenant l'organisme cible, traitée dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser. Doit être déclaré contaminé à l'issue de la manipulation (tissu de bananier infecté). Ce contrôle donne au minimum l'assurance d'un déroulement correct de la manipulation. Pour chaque série d'analyses, il est possible d'utiliser des échantillons végétaux contaminés (si possible *Musa spp*) préparés au laboratoire (échantillons de référence naturellement contaminés) ou des témoins commerciaux positifs (lyophilisés) à préparer selon les recommandations du fournisseur. Il est recommandé d'utiliser au minimum un contrôle positif processus de 2 espèces de BSV différentes sur les 4 détectées. Des témoins positifs pour BSOLV et BSMYV sont disponibles dans le commerce (fournisseur DSMZ). Le laboratoire pourra également se constituer une collection de témoins de référence pour les utiliser ultérieurement.
- Un contrôle positif d'amplification (A+) : solution d'acide nucléique cible, extraite au préalable, et devant produire un résultat positif à l'issue de la manipulation. Ceci garantissant la qualité de la manipulation pendant la phase d'amplification génique ainsi que le bon fonctionnement du matériel. Il est recommandé d'utiliser l'ADN de bananier infecté par au moins 2 des espèces de BSV. Il pourra **éventuellement** être complété par de l'ADN de PKW. Le PKW est un

bananier sauvage *M. balbisiana* cv. Pisang Klutuk Wulung, qui contient les quatre espèces de BSV ; il pourra être fournis par le laboratoire de référence si nécessaire.

- Un contrôle 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 PCR.

Remarque : Pour les échantillons non contaminés, la bande d'amplification des amorces microsatellites sera présente. Son absence mettra en évidence un problème d'inhibition de la PCR. Pour les échantillons contaminés, la bande d'amplification des amorces microsatellites peut être absente dans le cas d'une compétition avec les amorces BSV dans le mélange réactionnel.

D'autres contrôles peuvent être ajoutés si nécessaire et sont définis par la MOA22 (exemple : contrôles négatif d'amplification).

6. Appareillage et matériels

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces matériels. Des matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

Pour la mise en œuvre de cette méthode, le laboratoire disposera des appareils décrits dans la méthode officielle d'analyse MOA 022. Différents systèmes peuvent être utilisés, en fonction de l'appareillage disponible au laboratoire.

Afin d'alléger la lecture de la méthode, seules les valeurs cibles des grandeurs mesurées sont indiquées dans le corps du texte, en unités du système international ou unités dérivées. Les erreurs maximales tolérées (EMT) à prendre en considération sont données dans le tableau ci-après (dans le cas contraire, des spécifications sont précisées dans le texte de la méthode).

Tableau 3: EMT par grandeur

Grandeur	EMT
Volume	Se référer à la norme ISO 8655 (version en vigueur) ou utiliser les EMT suivantes : volume < à 10mL : EMT = $\pm 10\%$ volume \geq à 10mL : EMT = $\pm 5\%$
Masse	EMT = 10%
pH	EMT = 0,3 unité pH
Température	réfrigérateur : 5°C et EMT = $\pm 4^\circ\text{C}$ congélateur : $\leq -18^\circ\text{C}$ 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

Cette méthode a été validée en utilisant un broyeur à billes (de type « Homex© » modèle 6) avec broyage de l'échantillon 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. Tout autre système de broyage peut être utilisé, pourvu qu'il permette d'obtenir une qualité de broyage équivalente et limite les risques de contaminations croisées.

6.2 Thermocycleur pour PCR point final

Cette méthode a été validée avec le thermocycleur « Veriti® » (Applied Biosystems). Tout appareil équivalent possédant des caractéristiques comparables peut être utilisé.

7. Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Les échantillons reçus pour analyse doivent être dans un bon état de conservation, c'est-à-dire, ni desséchés, ni nécrosés, ni en cours de décomposition. Dans le cas contraire, le laboratoire émet des réserves à réception en précisant la raison. 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.

Le laboratoire doit mettre en place une procédure adaptée à son environnement (locaux, infrastructures...) visant à écarter tout risque de confusion et de contamination entre échantillons.

Le traitement individuel des échantillons doit être privilégié, notamment en présence d'échantillons asymptomatiques.

Le préparateur veillera à prélever les tissus les mieux conservés.

Pour le matériel frais, chaque prise d'essai est constituée d'au minimum 0,5 g de matériel végétal.

Pour le matériel déshydraté (échantillons lyophilisés ou en BOS), la prise d'essai est constituée d'au minimum 0,1 g de matériel végétal.

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Le délai entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse doit être le plus court possible.

Pour les feuilles prélevées dans de bonnes conditions, le délai entre la réception des échantillons frais et le début effectif de l'analyse ne doit pas dépasser 5 jours. En attente de l'analyse, les échantillons seront conservés à +5°C.

Si les échantillons ne peuvent être traités dans ce laps de temps, ils seront congelés à une température inférieure ou égale à -18°C, en attente de traitement (maximum 1 mois). Dans ce cas, la prise d'essai doit être effectuée, si possible, avant la congélation.

D'autres modes de conservation peuvent être envisagés : la lyophilisation, la dessiccation par la méthode de BOS (dessiccation en présence de chlorure de calcium). Ces modes de conservation peuvent avoir une incidence sur la charge virale des échantillons : ils peuvent parfois induire des résultats faussement négatifs (échantillons faiblement contaminés détectés négatifs). Lorsque le laboratoire est contraint d'utiliser du matériel lyophilisé ou en BOS, le rapport d'analyse doit mentionner cette particularité : « Echantillon traité après conservation (citer le mode de conservation) ».

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, jusqu'à au moins le quinzième jour calendaire suivant l'envoi au client du rapport d'analyse. Dans le cas d'un résultat positif ou indéterminé, ce délai est prolongé à 12 mois pour les reliquats qui le permettent.

Ce délai imposé est destiné à laisser le temps aux parties prenantes 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.

8. Mode opératoire

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

Pour le matériel déshydraté (échantillons lyophilisés ou selon la méthode BOS), la prise d'essai est constituée au minimum de 0,1 g de matériel végétal déshydraté et au maximum de 0,4 g de matériel végétal déshydraté.

Pour le matériel frais, chaque prise d'essai est constituée au minimum de 0,5 g de matériel végétal frais et au maximum de 2,0 g de matériel végétal frais.

L'utilisateur opérera selon une procédure adaptée à son contexte (infrastructures, organisation) qui vise à éviter tout risque de confusion entre échantillons ou de contamination d'un échantillon par un autre. Entre chaque prise d'essai, l'utilisateur veillera à désinfecter le matériel utilisé pour les prélèvements.

Cas particulier du regroupement des échantillons

Le regroupement par lot peut avoir des conséquences sur le seuil de détection de la méthode, ce mode d'analyse doit donc être choisi en connaissance de cause par le client. Il doit être mis en œuvre uniquement avec l'accord préalable, explicite et éclairé du client qui doit lui-même définir la conduite à tenir en cas de résultat positif sur le lot (par exemple, refaire une analyse individuelle).

En cas de regroupement d'échantillons (au maximum 5), il convient de peser un total de 1.0 g en empilant les 5 feuilles les unes sur les autres et en découpant un morceau de chaque.

Suite à la prise d'essai, les reliquats de matériel végétal sont conservés selon les modalités indiquées au paragraphe 7.3.

8.2 Broyage des échantillons

Broyer le matériel végétal dans le tampon de broyage (**annexe 1**), selon le ratio masse/volume de 1/10 (soit par exemple 0,5 g de matériel végétal frais pour 4,5mL de tampon), à l'aide d'un broyeur à billes, ou de toute autre méthode de broyage permettant d'obtenir des résultats équivalents.

Pour une prise d'essai sur matériel végétal déshydraté, le ratio préconisé est de 0,1 g de matériel déshydraté pour 4,5mL de tampon (à adapter proportionnellement selon la masse de matériel déshydraté constituant la prise d'essai).

Les broyats obtenus doivent être conservés à +5°C.

Après dépôt, les broyats sont conservés selon les modalités indiquées au paragraphe 7.3.

Remarque : le broyat obtenu à partir de matériel frais, peut être utilisé directement pour la détection du BBTv, du BBrMV et du CMV car le tampon de broyage et le ratio poids/volume sont identiques.

8.3 Extraction et mélange réactionnel pour la PCR multiplexe

Deux protocoles en fonction du génome du bananier sont décrits ci-dessous ; ils sont basés sur deux techniques différentes d'extraction du virus cible. Le mélange réactionnel diffère uniquement sur le volume d'eau.

8.3.1. Tous les génomes (génome A et génome B) : Immunocapture

Ce protocole, applicable à tous les génomes de bananier, est celui à mettre en œuvre impérativement pour les bananiers contenant du génome B : L'extraction s'appuie sur une étape immunologique appelée immunocapture qui permet de fixer les particules virales en suspension dans le jus de plante issu du broyat dans une cupule plastique dont les parois sont recouvertes d'anticorps spécifique au virus.

8.3.1.1 Coating

Établir soigneusement le plan de distribution (plan de plaque) et d'identification des extraits. Chaque échantillon (prise d'analyse) est au moins répété 1 fois soit 2 puits par échantillon.

Le coating se fait dans les tubes ou puits de plaques ensuite utilisés pour la PCR. Déposer dans chaque puits 30µL de l'anticorps de coating anti-BSV dilué au 1/200^{ème} dans du tampon carbonate (tampon de coating, recette type en annexe 1 ou tout autre tampon commercial équivalent). Fermer les puits. Dans la mesure du possible, effectuer une légère centrifugation afin faire descendre le coating au fond du puits.

Incuber dans une boîte hermétique « humide » pendant la nuit à +5°C.

8.3.1.2 Clarifications des extraits

Transférer le broyat dans des tubes de type Eppendorf en laissant environ 1 cm de vide pour une éventuelle congélation.

Centrifuger à 6 000 g pendant 5 minutes en conditions réfrigérées (par exemple à +5°C).

Remettre en suspension pour une congélation du tube.

8.3.1.3 Lavage

A l'issue du coating, faire 3 rinçages de la plaque ou des barrettes avec 100µL de tampon de lavage par puits.

Éliminer le liquide de lavage et sécher par retournement sur du papier absorbant.

8.3.1.4 dépôt des échantillons

Pour chaque échantillon, un minimum de 2 dépôts doit être réalisé pour la recherche du BSV.

Déposer 25µL du surnageant (§ 8.3.1.2) par puits. Fermer les puits. Dans la mesure du possible, effectuer une légère centrifugation afin de faire descendre le broyat au fond du puits.

Incuber 3 h à température ambiante dans une boîte hermétique « humide ».

Remarque : A partir de cette étape, porter des gants pour éviter la dégradation des ADN.

8.3.1.5 Lavage

Faire 3 rinçages avec 100µL de tampon de lavage par puits pour éliminer les débris végétaux.

Faire 2 rinçages avec 100µL d'eau distillée stérile pour éliminer les sels de tampon pouvant inhiber les enzymes du mélange réactionnel.

8.3.2 Tous les génomes (génom A et génome B) : PCR conventionnelle multiplexe (mélange réactionnel)

Remarque : Pendant toute la préparation de la réaction, le port des gants est obligatoire et l'ensemble des réactifs doit être maintenu au froid (glace ou utilisation de portoirs réfrigérés) pour limiter la dégradation des ADN.

Préparation du mélange d'amorce

Pour plus de facilité, il est suggéré de réaliser un mélange des amorces (10 amorces) dans lequel les concentrations de chaque espèce sont les suivantes :

[BSOLV] = [BSIMV] = 1 µM

[BSGFV] = [BSMYV] = 1,5 µM

Amorces microsatellites [AGMI] = 2 µM

Pour ce faire, préparer des solutions filles à des concentrations différentes pour les 5 couples d'amorces, selon le tableau ci-dessous :

Tableau 4 : Concentration des solutions d'amorces.

	OI-R	OI-F	Gf-R	Gf-F	Im-R	Im-F	My-R	My-F	AGMI 025	AGMI 026
Concentration des solutions filles (µM)	10	10	15	15	10	10	15	15	20	20

Prélever ensuite 100µL de chacune des amorces afin d'obtenir 1mL du mélange d'amorce qui sera ensuite utilisé dans la préparation du Mix.

Remarque : Si la demande d'analyse ne porte que sur certaines espèces, il est possible de préparer un mélange d'amorces uniquement constitué des amorces concernées, tout en conservant les amorces microsatellites.

Exemple : dans le cas d'une demande de détection des espèces BSOLV et BSGFV, prélever 100µL des 6 amorces (BSOLV-F/R, BSGFV-F/R et AGMI-F/R) et compléter à 1mL avec de l'eau.

Préparation du mélange réactionnel

2133 Dans la mesure du possible, le mix PCR multiplexe est préparé dans une salle DNA / RNA free.

La présente méthode a été validée avec le Kit GoTaq® G2 Hot Start Polymerase de Promega.

Tableau 5 : Mélange réactionnel pour la PCR (tous les génomes).

Réactifs	[solution-mère]	[puits]	Volume / puits (µL)
Eau			7,6
Buffer	5X	1X	5
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	1,5
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,5
Mélange d'Amorces		(1)	10
Go Taq G2 Hot start Polymerase	5 U/µL	2 U	0,4
	Total		25

(1): cf. tableau ci-dessous pour connaître les concentrations finales de chaque amorce dans un puits.

Tableau 6 : Concentration de chaque amorce par puits PCR.

Concentrations finales de chaque amorce dans le mix PCR [µM]									
OI-R	OI-F	Gf-R	Gf-F	Im-R	Im-F	My-R	My-F	AGMIO 25	AGMIO 26
0,4	0,4	0,6	0,6	0,4	0,4	0,6	0,6	0,8	0,8

Le dépôt de mix est de 25µL dans chaque microtube coaté.

Dans le cas des témoins PCR, des tubes non coâtés sont employés 22µL de mix sont déposés auxquels sont ajoutés 3µL de matrice (ADN ou eau). Dans la mesure du possible, effectuer une petite centrifugation afin de faire descendre le mélange réactionnel au fond du tube et d'éviter la formation de bulles.

8.3.3. Génome A exclusivement : Extraction d'ADN

Transférer le broyat dans des tubes de type Eppendorf en laissant environ 1 cm de vide pour une éventuelle congélation (à titre d'exemple, 1.5mL de broyat dans un tube de 2mL). Les tubes sont ensuite centrifugés à grande vitesse (à titre d'exemple 15 minutes à 13 000g) afin de culoter le broyat (l'utilisation d'une centrifugeuse réfrigérée est recommandée). Retirer le surnageant. Ce culot peut soit être conservé à +5°C (pendant quelques heures), soit être conservé à une température inférieure ou égale à -18°C (pendant quelques jours) en attente de l'extraction d'ADN ou être directement extrait.

Le kit initialement validé pour cette méthode est le DNeasy® Plant mini kit de Qiagen. L'ADN viral est extrait et purifié en suivant le protocole d'extraction Plant Tissue du fournisseur, en commençant par l'étape décrite dans le manuel, à savoir : « déposer 400µL de tampon AP1 et 4µL de RNase A dans chaque tube, bien homogénéiser ». Puis continuer les différentes étapes décrites.

L'éluion 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 inférieure ou égale à -18°C, en attente de la réalisation de l'amplification.

8.3.4 Génome A exclusivement : PCR conventionnelle multiplexe (mélange réactionnel)

Remarque : Pendant toute la préparation de la réaction, le port des gants est obligatoire et l'ensemble des réactifs doit être maintenu au froid (glace ou utilisation de portoirs réfrigérés) pour limiter la dégradation des ADNs.

Préparation du mélange d'amorce

Pour plus de facilité, il est suggéré de réaliser un mélange des amorces (10 amorces) dans lequel les concentrations de chaque espèce sont les suivantes :

[BSOLV] = [BSIMV] = 1 µM

[BSGFV] = [BSMYV] = 1,5 µM

Amorces microsatellites [AGMI] = 2 µM

Pour ce faire, préparer des solutions filles à des concentrations différentes pour les 5 couples d'amorces, selon le tableau ci-dessous :

Tableau 7 : Concentration des solutions d'amorces.

	OI-R	OI-F	Gf-R	Gf-F	Im-R	Im-F	My-R	My-F	AGMI 025	AGMI 026
Concentration des solutions filles (µM)	10	10	15	15	10	10	15	15	20	20

Prélever ensuite 100µL de chacune des amorces afin d'obtenir 1mL du mélange d'amorce qui sera ensuite utilisé dans la préparation du Mix.

Remarque : Si la demande d'analyse ne porte que sur certaines espèces, il est possible de préparer un mélange d'amorces uniquement constitué des amorces concernées, tout en conservant les amorces microsatellites.

Exemple : dans le cas d'une demande de détection des espèces BSOLV et BSGFV, prélever 100µL des 6 amorces (BSOLV-F/R, BSGFV-F/R et AGMI-F/R) et compléter à 1mL avec de l'eau.

Préparation du mélange réactionnel

Dans la mesure du possible, le mix PCR multiplexe est préparé dans une salle DNA / RNA free.

La présente méthode a été validée avec le Kit GoTaq® G2 Hot Start Polymerase de Promega.

Tableau 8 : Mélange réactionnel pour la PCR (génom A).

Réactifs	[solution-mère]	[puits]	Volume / puits (µL)
Eau			4,6
Buffer	5X	1X	5
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	1,5
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,5
Mélange d'Amorces		(1)	10
Go Taq G2 Hot start Polymerase	5 U/µL	2 U	0,4
ADN			3
	Total		25

(1): cf. tableau ci-dessous pour connaître les concentrations finales de chaque amorce dans un puits.

Tableau 9 : Concentration de chaque amorce par puits PCR.

Concentrations finales de chaque amorce dans le mix PCR [µM]									
OI-R	OI-F	Gf-R	Gf-F	Im-R	Im-F	My-R	My-F	AGMIO 25	AGMIO 26
0,4	0,4	0,6	0,6	0,4	0,4	0,6	0,6	0,8	0,8

Le volume final est de 25µL dans chaque puits soit 22µL de mélange réactionnel et 3µL d'ADN ou d'eau

8.4 Amplification et Électrophorèse

8.4.1. Programme du thermocycleur

Tableau 10 : Programme d'amplification.

Étape	Température	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95°C	2 min	1
Dénaturation	95°C	20 sec	30
Hybridation	60°C	30 sec	
Elongation	72°C	1 min	
Elongation finale	72°C	5 min	1
Conservation	12°C	∞	1

8.4.2 Électrophorèse et Révélation

Déposer environ 10 μ L de l'amplifiât sur un gel d'agarose à 3% pour bien démarquer les bandes d'amplification des 4 espèces de BSV et celles des microsatellites (par exemple 3 g d'agarose dans 100mL de TAE).

Une échelle de poids moléculaire, dont l'intervalle encadre la taille des fragments attendus, doit être déposée sur chaque ligne de dépôt afin de définir la taille des fragments obtenus. Les tailles des bandes attendues pour chaque espèce sont décrites au § 5.3.3.

Effectuer l'électrophorèse (à titre indicatif, environ 100 volts durant environ 1h30) dans du tampon de migration à concentration identique à celui utilisé pour réaliser le gel.

Pour une meilleure discrimination de chaque espèce, notamment de BSVOL et BSVGF, il est conseillé de placer les contrôles processus positifs au milieu du gel et d'augmenter la durée de la migration, en s'aidant du front de migration du tampon de charge.

Une fois l'électrophorèse finie, colorer le gel dans un bain de bromure d'éthidium (BET) et révéler 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 au BET 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.

9. Résultats

9.1 Contrôle de la validité des résultats

L'observation et conformité à l'attendu des résultats obtenus sur les témoins décrits au § 5.6 sont un préalable à l'interprétation des résultats obtenus sur les échantillons soumis à analyse.

L'analyse est validée **pour le protocole avec extraction par immunocapture (tous les génomes de bananiers)** si les conditions listées dans le tableau 11 sont vérifiées.

Tableau 11 : Résultats attendus pour les différents témoins utilisés pour le protocole avec extraction par immunocapture (tous les génomes de bananiers).

Type de témoins		Amorces BSV	Amorces microsatellites
Tous les génomes (génomome A et génomome B) : Témoins d'immunocapture (Processus)	Contrôle négatif de processus (T- ou TS) Matrice saine	Absence de bande d'amplification	Absence de bande d'amplification
	Contrôle absence d'accrochage aspécifique (TS PKW) Matrice PKW	Absence de bande d'amplification	Absence de bande d'amplification
	Contrôle positif de processus (T+) Matrice BSV (OL, GF, IM, MY)	Bande d'amplification	Absence de bande d'amplification
Tous les génomes (génomome A et génomome B) : Témoins d'amplification	Contrôle négatif d'amplification * (A-) ADN sain	Absence de bande d'amplification	Bande d'amplification
	Contrôle positif d'amplification * (A+) ADN PKW*	Bande d'amplification	Bande d'amplification ou absence si phénomène de compétition
	Contrôle positif d'amplification (A+) ADN BSV (OL, GF, IM, MY)	Bande d'amplification	Bande d'amplification ou absence si phénomène de compétition
	Contrôle négatif d'amplification (A-) Eau	Absence de bande d'amplification	Absence de bande d'amplification

* : contrôles optionnels

L'analyse est validée **pour le protocole avec extraction d'ADN par kit commercial (génom A exclusivement)** si les conditions listées dans le tableau 12 sont vérifiées.

Tableau 12 : Résultats attendus pour les différents témoins utilisés pour le protocole avec extraction d'ADN par kit commercial (génom A exclusivement).

Type de témoins		Amorces BSV	Amorces microsatellites
Génom A : Témoins de processus et PCR	Contrôle négatif de processus (T- ou TS) Matrice saine	Absence de bande d'amplification	Bande d'amplification
	Contrôle positif de processus (T+) Matrice BSV (OL, GF, IM, MY)	Bande d'amplification	Bande d'amplification ou absence si phénomène de compétition
Génom A : Témoins d'amplification	Contrôle positif d'amplification (A+) ADN BSV (OL, GF, IM, MY)	Bande d'amplification	Bande d'amplification ou absence si phénomène de compétition
	Contrôle négatif d'amplification (A-) Eau	Absence de bande d'amplification	Absence de bande d'amplification
	Contrôle positif d'amplification* (A+) ADN PKW*	Bande d'amplification	Bande d'amplification ou absence si phénomène de compétition

* : contrôles optionnels

9.2 Calculs et expression des résultats

L'analyse est qualitative. Le test est négatif pour les échantillons ne présentant aucune bande à la taille attendue. Le test est positif pour les échantillons présentant une bande à la taille attendue.

Si les contrôles processus sont validés et que l'on détecte une très faible bande BSV peu visible sur gel, l'échantillon peut être considéré comme indéterminé et envoyé pour confirmation au laboratoire de référence.

Les résultats s'interprètent de la manière suivante :

Tableau 13 : Interprétation des résultats des échantillons.

Analyse		Résultat
Puits 1	Puits 2	
+	+	POSITIF
+	-	PCR à refaire. Si au moins 1 positif sur 2 lors de la reprise, le résultat final est interprété comme positif, sinon il est interprété comme négatif.
+	Indéterminé	POSITIF
Indéterminé	Indéterminé	PCR à refaire. <u>Cas 1</u> : Si au moins 1 positif sur 2 lors de la reprise, le résultat final est interprété comme positif. <u>Cas 2</u> : Si, lors de la reprise, le résultat est indéterminé/ - ou indéterminé/indéterminé, le résultat final est interprété comme indéterminé, <u>Cas 3</u> : sinon il est interprété comme négatif.
-	Indéterminé	PCR à refaire. <u>Cas 1</u> : Si au moins 1 positif sur 2 lors de la reprise, le résultat final est interprété comme positif. <u>Cas 2</u> : Si, lors de la reprise, le résultat est indéterminé/ - ou indéterminé/indéterminé, le résultat final est interprété comme indéterminé, <u>Cas 3</u> : sinon il est interprété comme négatif.
-	-	NEGATIF

Expression des résultats

Le rapport d'analyse présentera un résultat d'analyse pour la détection du BSV sous la forme : non détecté / détecté / indéterminé, selon les formulations suivantes (ou des formulations équivalentes).

Résultat Positif : « Banana streak virus détecté »

Un commentaire peut être ajouté sur l'espèce détectée (BSOLV (Obino l'Ewai), BSGFV (Gold Finger), BSIMV (Imové), BSMYV (Mysore);

Exemple : **Banana streak virus détecté, espèce BSGFV »**

Résultat Négatif : « Banana streak virus non détecté »

Résultat indéterminé : « Résultat indéterminé pour la détection du Banana streak virus »

Lorsque le protocole avec extraction d'acides nucléiques à l'aide d'un kit commercial aura été utilisé (protocole applicable exclusivement sur génome A), cette modalité d'extraction devra être explicitement mentionnée sur le rapport, selon la formulation suivante (ou une formulation équivalente) :

Méthode d'analyse utilisée : ANSES/LSV/MA 044 - Détection du Banana streak virus (BSV) sur bananier, espèces Obino l'Ewai, Goldfinger, Imové et Mysore par PCR conventionnelle multiplexe – utilisation du protocole d'extraction d'ADN à l'aide d'un kit commercial (protocole applicable exclusivement aux bananiers de génome A).

Par défaut, lorsque la mention du protocole d'extraction ne sera pas précisée sur le rapport d'analyse, il est implicitement convenu que le protocole d'immunocapture a été utilisé.

Reliquats d'échantillons : cf. § 7.3.

10. Caractéristiques de performance de la méthode

Les caractéristiques de performances de la méthode MA-044 version 2 ont été évaluées par le LSV-RAPT (PJ-BSV01-2016).

Tableau 14 : Synthèse des caractéristiques de performance de détection du BSV par IC-PCR multiplexe sur bananier (génom A et génome B).

Caractéristique	Paramètre	Valeur ou résultat obtenu lors de la caractérisation	Principales informations relatives aux modalités de réalisation de la caractérisation
Inclusivité (anc. sensibilité diagnostique)	Pourcentage d'échantillons détectés parmi les échantillons cibles	100%	39 échantillons cibles, provenant de 8 pays différents avec du génome A et B, testés en duplicat : 2 plaques (2 puits/plaque).
Exclusivité (anc. spécificité diagnostique)	Pourcentage d'échantillons non détectés parmi les échantillons non-cibles	100%	18 échantillons non-cibles, dont 9 sains (surtout génome B) et 9 infectés par d'autres pathogènes du bananier (bactérie, virus, champignon), testés en duplicat : 2 plaques (2 puits/plaque).
Spécificité analytique (anc. exactitude)	Pourcentage de vrais positifs et de vrais négatifs parmi des échantillons cibles et des échantillons non-cibles	100%	39 échantillons cibles testés en duplicat et 18 échantillons non-cibles testés en duplicat : 2 plaques (2 puits/plaque).
Sensibilité analytique (ou seuil de détection)	Niveau de concentration le plus bas pour lequel 100% des résultats sont positifs	1/100 pour les 4 espèces 1/500 pour OI et GF	8 échantillons cibles : (2 cibles par espèces de BSV) de niveau de contamination élevé (bande PCR intense) avec 5 niveaux de dilution par échantillon, testés en duplicat : 2 plaques (2 puits/plaque).
Répétabilité	Pourcentage d'accords entre résultats interplaques pour les mêmes échantillons	96%	Les résultats obtenus pour la caractérisation du seuil de détection sont repris pour évaluer la répétabilité.
Reproductibilité	Pourcentage d'accords entre résultats pour les mêmes échantillons	96%	Essai bilatéral

Notes :

La référence du réactif sérologique NEOGEN utilisé lors de la validation initiale de la méthode (rapport d'évaluation PJ-BSV01-Sept_2016) est le 1267, date d'expiration 04/2016.

L'anticorps de coating BSV (AC Diagnostics) distribué en France par la société Sediag (Réf BSV-SRA), date d'expiration 04/2018 a été utilisé dans rapport de validation PJ-BSV01-2016 additif 2017.

L'anticorps de coating BSOLV distribué par la société Agdia (Réf :CAB72200) lot 00134, date d'expiration 02/2022 est celui utilisé dans le rapport complémentaire de validation PJ-BSV01-2022.

Les caractéristiques de performance de la méthode de détection du BSV sur bananier de génome A sont présentées dans le tableau 15.

Tableau 15 : Synthèse des caractéristiques de performance de détection du BSV par PCR multiplexe sur les bananiers de génome A.

Caractéristique	Paramètre	Valeur ou résultat obtenu lors de la caractérisation	Principales informations relatives aux modalités de réalisation de la caractérisation
Inclusivité (anc. sensibilité diagnostique)	Pourcentage d'échantillons détectés parmi les échantillons cibles	100%	8 échantillons cibles, de génome A, testés en duplicat : 2 plaques (2 puits/plaque).
Exclusivité (anc. spécificité diagnostique)	Pourcentage d'échantillons non détectés parmi les échantillons non-cibles	100%	8 échantillons non-cibles, dont 5 et 3 infectés par des virus pathogènes du bananier, testés en duplicat : 2 plaques (2 puits/plaque).
Spécificité analytique (anc. exactitude)	Pourcentage de vrais positifs et de vrais négatifs parmi des échantillons cibles et des échantillons non-cibles	100%	8 échantillons cibles testés en duplicat et 8 échantillons non-cibles testés en duplicat : 2 plaques (2 puits/plaque).
Sensibilité analytique (ou seuil de détection)	Niveau de concentration le plus bas pour lequel 100% des résultats sont positifs	1/1000 pour les 4 espèces 1/5000 pour IMV et GF	4 échantillons cibles : (1 cible par espèces de BSV) de niveau de contamination élevé (bande PCR intense) avec 5 niveaux de dilution par échantillon, testés en duplicat : 2 plaques (2 puits/plaque).

Note : Le kit d'extraction utilisé est le DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) et l'amplification utilise la: Gotaq G2 Hot Start Polymerase (Promega).

Annexe 1

Tampon de broyage :

Sodium sulfite (Na_2SO_3)	1,3 g
PVP (MW 24-40)	20,0 g
Ovalbumine	2,0 g
Tween 20	20,5 g
PBS 10X	100 mL
Eau	q.s.p. 1 L

Ajuster à pH=7,4

Tampon carbonate :

Na_2CO_3 (sodium carbonate)	1,59 g
NaHCO_3 (sodium bicarbonate)	2,94 g
H_2O distillée stérile	q.s.p. 1 L
pH final	9.6

Bibliographie

Geering, A.D.W., McMichael, L.A., Dietzgen, R.G., and Thomas, J.E. (2000). Genetic Diversity Among Banana streak virus Isolates from Australia. **Phytopathology** Vol 90 p 917-921.

Geering, A.D.W., et al. (2011). Complete genome sequence of a novel badnavirus, banana streak IM virus. **Archives of Virology** 156 (4): 733-737.

Iskra-Caruana M.L. (2014) Risque Banana streak virus (BSV) en cas d'introduction de vitro- plants de bananier plantain issus respectivement de bananiers plantains originaires des DOM (Demande « n° **2014-SA- 0178 BSV / Plantain** »).

King, A.M.Q., Adams, M.J., Lefkowitz, E.J., and Carstens, E. B., (Eds.), (2012). Virus taxonomy: Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. NY, USA: Elsevier Academic Press.

Lagoda P., Noyer J.L., Dambier D., Baurens F.C., Grapin A., Lanaud C. (1998). Sequence tagged microsatellite sites (STMS) markers in the Musaceae. **Molecular Ecology**, 7 : p. 659-666.

Le Provost G., Iskra-Caruana M.L., Acina I. and Teycheney, P.Y. (2006) Improved detection of episomal Banana streak viruses by multiplex immunocapture PCR. **Journal of Virological Methods** 137, 7-13.

Lockhart, B.E.L. (1995) Banana streak badnavirus infection in Musa: epidemiology, diagnostic and control ASPAC Food and fertilizer technology center (Taiwan) technical bulletin 143, 1-11.