

**Méthode d'analyse en santé des végétaux**

**RÉFÉRENCE : ANSES/ LSV / MA 039 version 5**

**Juillet 2020**

# Détection de *Xylella fastidiosa* par PCR en temps réel sur végétal

**Laboratoire de la santé des végétaux**

**Laboratoire national de référence : Mandat « Bactéries sur autres matrices »**



## Historique de la méthode

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

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

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

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

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
v1	Sans objet	Octobre 2015	Version initiale
v2*	Mineures	Mars 2018	<p>Stockage des reliquats d'échantillons en attente de résultat à 5°C et non à une température <math>\leq -18^{\circ}\text{C}</math> afin d'éviter les cycles de congélation/décongélation des reliquats</p> <p>Précision en terme de vocabulaire pour les termes « prélèvement » et « prise d'essai ».</p> <p>Introduction de la possibilité de prélever sur rameaux non ligneux et tiges</p> <p>Introduction d'une possibilité de différer le processus analytique en cours au point 8.2.3.</p> <p>Le tableau relatif à la règle d'interprétation des résultats au point 9.2 a été complété afin de prendre en compte l'ensemble des combinaisons de résultats possibles.</p> <p>Simplification de certains passages pour rendre la méthode plus lisible</p> <p>Ajout de précisions</p> <p>Extension à tous végétaux déclarés hôtes ou non</p> <p>Application de la règle de cut-off de la publication Harper <i>et al.</i>, 2010, erratum 2013</p> <p>Ajout de la possibilité d'émettre des résultats sur extrait dilué au dixième</p>
v3	Mineures	Juin 2018	Correction d'une erreur éditoriale en page 2



V4**	Majeures	Février 2019	<p>Possibilité de prélever des fragments de xylème sur rameaux ligneux</p> <p>Introduction d'une étape de sonication des broyats permettant de disloquer les biofilms formés par <i>X. fastidiosa</i> dans les vaisseaux du xylème afin de permettre une extraction plus efficace des cellules bactériennes (toutes matrices)</p> <p>Introduction d'un protocole d'extraction de l'ADN basé sur l'utilisation du CTAB pour les échantillons d'olivier (<i>Olea europaea</i>) et chênes (<i>Quercus</i> spp.) afin d'améliorer le seuil de détection sur ces matrices riches en composés inhibiteurs de la PCR</p> <p>Modification du volume d'ADN (doublement) déposé dans le mélange réactionnel de la PCR afin d'améliorer le seuil de détection de la méthode (toutes matrices)</p> <p>Suppression de la méthode manuelle d'extraction d'ADN avec le kit QuickPick™</p> <p>Passage de la masse minimale du prélèvement à 1 g</p>
V5***	Mineures	Juillet 2020	<p>Suppression d'un des 2 niveaux de cut off pour conserver uniquement celui à 38. Cela engendre la suppression du résultat de type « Indéterminé » pour conserver uniquement 2 types de résultats : « positif » et « négatif ».</p> <p>Modification du volume d'ADN déposé dans le mélange réactionnel de la PCR pour toutes matrices autres qu'olivier (<i>Olea europaea</i>) et chênes (<i>Quercus</i> spp.) afin d'éviter les problèmes d'inhibition de la PCR.</p> <p>Libellé plus explicite quant à la possibilité de réaliser des dilutions au 10<sup>ème</sup> des extraits d'ADN en cas d'inhibition du contrôle positif de processus</p> <p>Mise à jour du programme d'extraction pour le KingFisher™ mL suite à l'évolution du logiciel BindIt</p>

\*La version 2 a fait l'objet d'une consultation du 06/02/2018 au 28/02/2018 sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.

\*\*La version 4 a fait l'objet d'une consultation du 16/01/2019 au 10/02/2019 sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.

\*\*\*La version 5 a fait l'objet d'une consultation du 24/06/2020 au 08/07/2020 sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français



## Avant-propos

La présente méthode a été validée par :

**Anses - Laboratoire de la santé des végétaux– Unité bactériologie, virologie et OGM**

Laboratoire National de Référence : **Mandat « Bactéries sur autres matrices »**

Adresse : 7 rue Jean Dixméras

49044 Angers CEDEX 01

Contact : [angers.lsv@anses.fr](mailto:angers.lsv@anses.fr)

La méthode initiale a été initialement optimisée, évaluée et validée par l'équipe de bactériologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux (rapport de caractérisation et de validation de la méthode MA039 version 1 en date du 02 mai 2016).

La version 4 de la méthode a été caractérisée et validée par l'équipe de bactériologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux (rapport de caractérisation et de validation de la méthode MA039 version 4).

Cette version 5, de par la nature des modifications apportées, n'a nécessité ni caractérisation, ni validation par le Laboratoire de la Santé des Végétaux. Les résultats des versions 1 et 4 ont été repris et analysés avec les règles de la version 5.

Le travail de relecture a été effectué par l'Unité de Coordination de la Référence du Laboratoire de la Santé des Végétaux.



## Sommaire

<b>Avant-propos</b> .....	<b>4</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>7</b>
<b>Avertissements et précautions de sécurité</b> .....	<b>9</b>
<b>1. Objet et domaine d'application</b> .....	<b>10</b>
<b>2. Documents de référence</b> .....	<b>10</b>
<b>3. Termes, sigles et définitions</b> .....	<b>10</b>
<b>4. Principe de la méthode</b> .....	<b>11</b>
<b>5. Réactifs</b> .....	<b>12</b>
5.1 Eau.....	12
5.2 Kit d'extraction d'ADN.....	12
5.3 Oligonucléotides .....	12
5.4 Kit de PCR en temps réel .....	13
5.5 Autres réactifs .....	13
5.6 Autres consommables à usage unique .....	13
5.7 Contrôles et témoins.....	13
<b>6. Appareillage et matériels</b> .....	<b>15</b>
<b>7. Échantillons</b> .....	<b>17</b>
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons .....	17
7.2 Conservation des échantillons avant analyse .....	17
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse.....	17
<b>8. Mode opératoire</b> .....	<b>19</b>
8.1 Préparation des échantillons pour analyse (=prélèvement).....	19
8.2 Extraction de l'ADN total.....	21
8.2.1 Protocole QuickPick™ pour matrices autres qu'oliviers et chênes. ....	21
8.2.2 Protocole CTAB pour matrices olivier et chêne. ....	23
8.3 Test de détection par PCR en temps réel .....	24
8.3.1 Conditions d'amplification A après extraction d'ADN au CTAB sur olivier et chênes .....	24
8.3.2 Conditions d'amplification B après extraction d'ADN avec le kit QuickPick™ sur matrices autres qu'olivier et chênes .....	25
<b>9. Résultats</b> .....	<b>27</b>
9.1 Contrôle de la validité des résultats .....	27
9.2 Calculs et expression des résultats .....	27



<b>10. Caractéristiques de performance de la méthode.....</b>	<b>29</b>
<b>Annexe 1 Programme d'extraction pour l'automate KingFisher™ mL (Thermo Fisher Scientific) automate pour le kit QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile).....</b>	<b>32</b>
<b>Annexe 2 Programme d'extraction pour l'automate KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processors (Thermo Fisher Scientific) automate pour le kit QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile) .....</b>	<b>35</b>
<b>Annexe 3 : Réactifs extraction CTAB .....</b>	<b>38</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>39</b>



## Introduction

*Xylella fastidiosa* (Wells *et al.* 1987) est une bactérie phytopathogène réglementée dans l'Union Européenne. Elle est classée comme organisme de quarantaine prioritaire dans le règlement d'exécution (UE) 2019/2072 de la Commission du 28 novembre 2019 établissant des conditions uniformes pour la mise en œuvre du règlement **(UE) 2016/2031 du Parlement européen et du Conseil du 26 octobre 2016**. Il s'agit également d'un organisme de lutte obligatoire de façon permanente sur tout le territoire français, au sens de l'arrêté du 31 juillet 2000. *Xylella fastidiosa* (*X. fastidiosa*) est également classée en catégorie 1 dans l'arrêté du 15 décembre 2014 relatif à la liste des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les espèces végétales. L'arrêté du 22 mai 2015 relatif à la prévention de l'introduction du *X. fastidiosa* précise les conditions de lutte obligatoire, d'importation de végétaux spécifiés, de circulation de végétaux spécifiés dans l'Union Européenne et les obligations de déclaration en cas de présence ou de suspicion de *X. fastidiosa*.

*X. fastidiosa* est une bactérie du xylème présente sur le continent américain sur une large gamme d'hôtes. Il a été décrit à ce jour cinq sous-espèces de la bactérie, chacune plus ou moins inféodée à une gamme de plantes hôtes et/ou à une région géographique. Malgré un statut d'organisme réglementé de quarantaine pour l'Union Européenne et l'existence d'une réglementation à l'importation, *X. fastidiosa* est dorénavant un organisme émergent en Europe, avec la déclaration fin 2013 d'un foyer sur olivier en Italie (Loconsole *et al.*, 2014). En 2014, la bactérie a également été décrite en Iran sur vigne et amandier (Amanifar *et al.*, 2014). En France, la bactérie a été isolée en 2012 à partir de plants de caféiers (*Coffea arabica* et *C. canephora*) importés d'Amérique latine. En juillet 2015, la bactérie a été découverte sur le territoire corse, notamment sur polygale (*Polygala myrtifolia*), avant d'être détectée sur de nombreuses autres espèces végétales. En septembre 2015, des polygales étaient également détectés positifs à *X. fastidiosa* en région PACA. Depuis 2016, la bactérie est également présente en Allemagne (éradiquée), en Espagne et au Portugal depuis 2018.

Les principaux symptômes provoqués par *X. fastidiosa* sont des brûlures foliaires, suivies dans certains cas d'un dessèchement généralisé de la plante et de chloroses foliaires. Le site de l'OEPP, EPPO Global Database, propose une photothèque relative à la symptomatologie de *X. fastidiosa* (<https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA/photos>). Une fiche de reconnaissance des symptômes est disponible sur le site de l'Anses (<https://www.anses.fr/fr/system/files/VEG-Fi-XylellaFastidiosa.pdf>) et sur le site du ministère en charge de l'agriculture (<https://agriculture.gouv.fr/xylella-liens-utiles-et-documentation>). De nombreuses espèces végétales contaminées par la bactérie peuvent rester asymptomatiques et présenter de faibles à forts taux de contamination. Ainsi, l'importation de matériel végétal en provenance de zones contaminées par *X. fastidiosa* constitue une voie d'introduction pour les zones indemnes. A contrario, la symptomatologie n'étant pas caractéristique, des échantillons supposés symptomatiques peuvent présenter de faibles taux de contamination. La gamme d'hôtes de *X. fastidiosa* comprend plus de 560 espèces végétales appartenant à plus de 82 familles botaniques différentes (EFSA, 2018).



Une méthode d'analyse a été publiée par l'Anses (MA039) et a été officialisée par le Ministère en charge de l'agriculture, en particulier dans le but de la délégation des analyses officielles au réseau des laboratoires agréés. Cette méthode consiste en une extraction d'ADN de l'échantillon végétal avec un kit commercial suivie d'une PCR en temps réel.

Le rapport de caractérisation et de validation de la MA039 version 1 (mai 2016) a mis en évidence que la valeur du seuil de détection est sujette à d'importantes variations selon les espèces végétales analysées (présence de molécules inhibitrices de la PCR). Une dégradation des performances est particulièrement observée pour la matrice olivier (*Olea europaea*) ou oléastre (*Olea europaea* var. *sylvestris*) et sur certains chênes (*Quercus* spp.).

Faisant suite aux résultats observés lors du test interlaboratoires de comparaison de méthodes organisé dans le cadre du projet européen PONTE par le CNR de Bari, une étude méthodologique a été engagée par le LSV sur la base de travaux réalisés en collaboration avec l'INRAE (IRHS-Emersys) d'Angers et a abouti à l'amélioration du protocole d'analyse. Lors de la préparation des échantillons, une étape de sonication est ajoutée afin de rompre les biofilms formés par *X. fastidiosa*. L'utilisation de l'extraction d'ADN au CTAB (Cetyl TrimethylAmmonium bromide) décrite dans le protocole OEPP PM7/24 (4) (OEPP, 2019) remplace celle avec le kit QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile) pour les matrices olivier (*Olea europaea*) et chêne (*Quercus* spp.). Les échantillons d'olivier naturellement contaminés ont été fournis par le partenaire du projet PONTE (CNR Bari).

L'analyse des résultats des laboratoires agréés suite à la mise en œuvre de la version 4 de la MA039 a permis de mettre en évidence l'apparition de problèmes d'inhibition de la PCR sur les matrices autres qu'olivier (*Olea europaea*) et chênes (*Quercus* spp.). Ces problèmes sont apparus suite à l'extraction d'ADN avec le kit QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile) et dans les conditions d'amplification de la version 4 de la méthode. Dans la présente version, les conditions d'amplification sont donc modifiées pour ces matrices, et reprennent les conditions de la version 3 de la méthode.





## **Avertissements et précautions de sécurité**

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

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

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

**La détention et/ou la manipulation de la bactérie *Xylella fastidiosa* est soumise à l'obtention d'un arrêté préfectoral d'agrément en accord avec le règlement de santé végétale 2016/2031. Il est nécessaire que les installations de laboratoire permettent le contrôle des déchets solides, liquides et des insectes vecteurs afin de manipuler les échantillons végétaux dans le cadre de la détection de *X. fastidiosa*. Le laboratoire doit mettre en œuvre les mesures nécessaires pour garantir la non-dissémination de cet organisme dans l'environnement.**

**Tout fragment de matériel végétal (quel que soit son statut) doit être détruit par autoclavage ou autre moyen inactivant les bactéries, ainsi que tous les consommables avec lesquels ils ont été en contact.**

**Tout matériel utilisé lors du processus doit être désinfecté.**



## 1. Objet et domaine d'application

La présente méthode a pour objet la détection de la bactérie phytopathogène *X. fastidiosa* sur toutes plantes, qu'elles soient symptomatiques ou non. La présence de *X. fastidiosa* est mise en évidence par un test de détection par PCR en temps réel. Elle s'applique sur pétioles, nervures centrales, tiges, rameaux non ligneux, et sur tissus du xylème prélevés sur rameaux ligneux. La méthode ne s'applique pas sur végétaux en dormance (ex : bouture, plante à feuilles caduques en repos végétatif).

Cette méthode est qualitative, elle permet de détecter la présence de *X. fastidiosa* dans la limite du seuil de détection de la technique employée mais ne permet pas de quantifier la cible dans l'échantillon analysé, ni d'identifier la sous-espèce présente.

-Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme indemnes de *X. fastidiosa* ou contaminés 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 contaminés par *X. fastidiosa*.

L'utilisation d'un couple d'amorces et d'une sonde marquée, dont la combinaison est spécifique de *X. fastidiosa*, et ce quelle que soit la sous espèce considérée, permet de détecter et d'amplifier des portions discriminantes de l'ADN génomique de cette bactérie.

## 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.

## 3. Termes, sigles et définitions

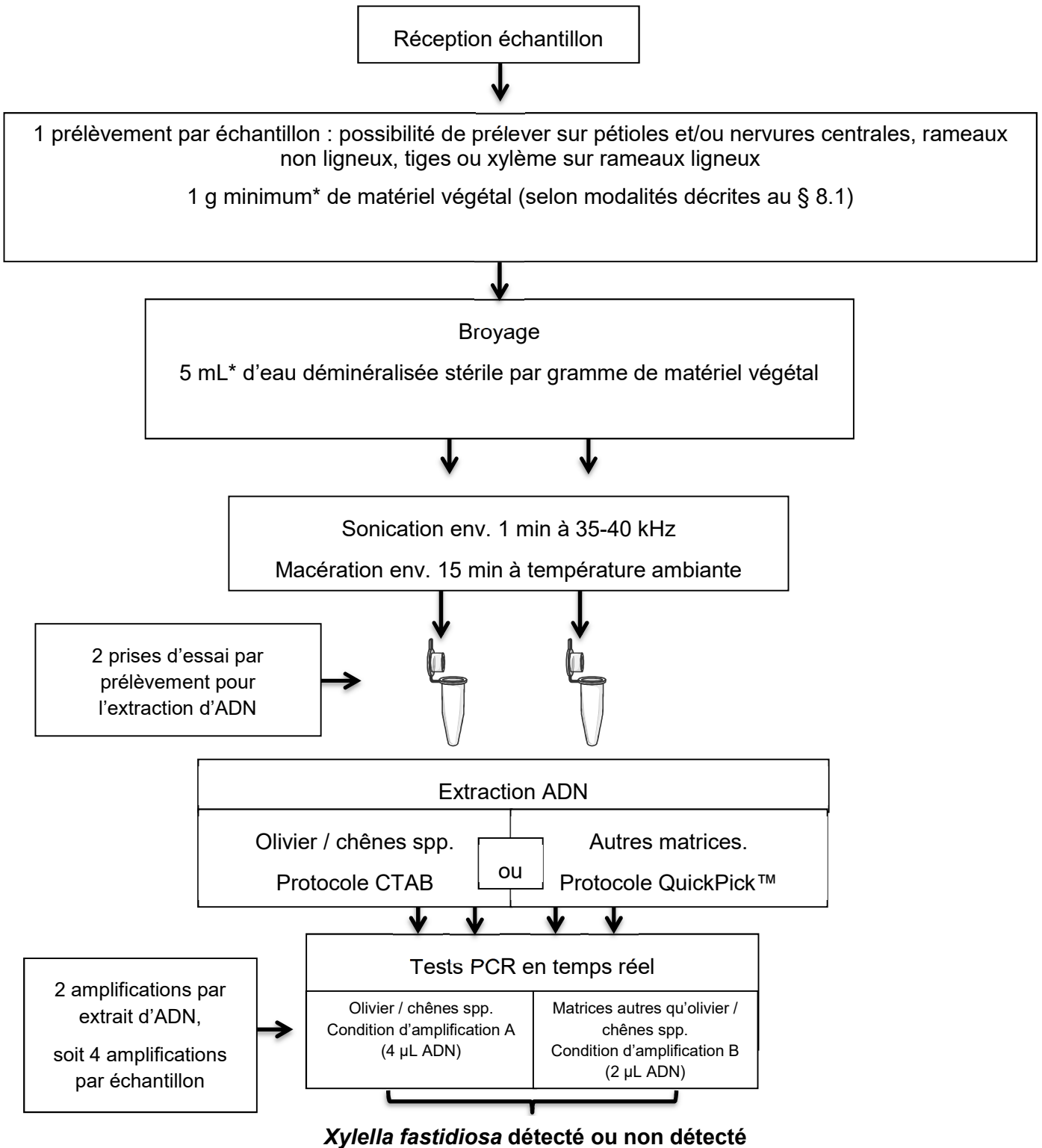
Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans les méthodes officielles du ministère chargé de l'agriculture est issu des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP...).

Le glossaire GLO-001 reprend les principales définitions. L'attention des lecteurs est attirée sur le fait que les termes intégrés au glossaire ne sont, en règle générale, pas spécifiquement repérés dans le corps des méthodes officielles.



## 4. Principe de la méthode

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



\* en cas de masse supérieure, respecter le rapport volume/masse



## 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, le manipulateur doit veiller (par l'utilisation de produits et consommables certifiés, par le nettoyage, par la stérilisation ou tout autre traitement approprié) à l'absence dans l'eau, produits et consommables utilisés, de contaminant (ADN), de nucléase, d'inhibiteur ou de tout autre élément pouvant influencer sur le résultat.

Les recommandations des fournisseurs concernant les conditions de stockage avant utilisation, seront suivies, ainsi que la conservation en cours d'utilisation. A défaut, le laboratoire définira les conditions qu'il jugera optimales.

### 5.1 Eau

#### Préparation d'échantillons

Les macérats doivent être réalisés avec de l'eau de qualité analytique stérile de type déminéralisée ou osmosée.

#### Analyse de PCR en temps réel

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

### 5.2 Kit d'extraction d'ADN

L'ADN total des échantillons est extrait et purifié à l'aide d'un kit d'extraction d'ADN de plante disponible dans le commerce. Le type de kit d'extraction validé par le LNR pour cette méthode est le QuickPick™ SML Plant DNA Kit (Bio-Nobile).

### 5.3 Oligonucléotides

Les séquences (5'- 3') des amorces et de la sonde sont les suivantes :

- XF-F\* : CACGGCTGGTAACGGAAGA
- XF-R\* : GGGTTGCGTGGTCAAATCAAG
- XF-P\* : [6-FAM]-TCGCATCCCGTGGCTCAGTCC-[BHQ1]

\* Cible des amorces XF-F et XF-R et de la sonde XF-P : 16S rRNA processing protein rimM (XF\_0108) (Harper *et al.*, 2010, Erratum 2013)



Les amorces doivent être au minimum de qualité RP cartridge et la sonde de qualité HPLC (exemples des critères de qualité du fournisseur Eurogentec). Dans le cas où d'autres fournisseurs proposent des critères de qualité différents, le laboratoire doit s'assurer de l'équivalence du niveau de performance.

#### 5.4 Kit de PCR en temps réel

Le kit validé par le Laboratoire National de Référence (LNR) pour cette méthode est le TaqMan™ Fast universal PCR Master Mix (2X), no AmpErase™ UNG référence catalogue Applied Biosystems novembre 2017 n°4352042.

#### 5.5 Autres réactifs

- BSA (qualité biologie moléculaire - attention: ne pas utiliser de BSA acétylée)
- Tampon CTAB (annexe 4)
- Chloroforme : alcool iso amylique (24 :1) (qualité biologie moléculaire)
- 2-propanol (isopropanol)
- Ethanol 70% vol
- Produits courants de désinfection d'un laboratoire de microbiologie et de biologie moléculaire

#### 5.6 Autres consommables à usage unique

- Coupelles de pesée ou autre système de pesée adapté
- Sacs de broyage avec gaze de filtration à mailles en nylon à usage unique
- Cônes à filtre pour pipettes de volumes adaptés (plage 0,5 µL à 5 mL)
- Microtubes stériles 2 mL et 1,5 mL en fonction des étapes des protocoles
- Microtubes ou capillaires (qualité biologie moléculaire) de volume adapté au thermocycleur temps réel utilisé, à paroi fine, en barrette de 4 ou 8 puits ou en plaque de 96 puits
- Consommables spécifiques à l'utilisation des automates

Exemples de consommables spécifiques à l'utilisation des automates :

- Barrettes de tubes 5-Tube strip (1mL) et peignes 5-Rod Cover (Qiagen) pour le BioSprint 15
- Barrettes de tubes KingFisher™ mL tube strip 5 et peignes KingFisher™ mL Tip comb 5 (Thermo Fisher Scientific) pour le KingFisher™ mL
- Microplaques de 96 puits « KingFisher 96 plate », microplaque « KingFisher 96 Deepwell plate » et « tip comb » pour plaque 96 puits pour le KingFisher™ Flex

#### 5.7 Contrôles et témoins

La technique de détection de régions cibles d'ADN d'un organisme par la technique de PCR en temps réel requiert l'utilisation d'une série de contrôles et témoins permettant de valider la bonne



qualité de la manipulation. Ces contrôles et témoins ont différentes fonctions et leur utilisation permet de garantir que :

- L'opérateur a correctement suivi le protocole,
- Les consommables et réactifs utilisés étaient de qualité suffisante,
- Les volumes prélevés à l'aide des micropipettes, les températures et durées de réaction, la concentration et le pH des solutions utilisées étaient corrects,
- L'extrait d'ADN était suffisant en quantité et amplifiable (pas d'interférence avec des composés inhibiteurs),
- Il n'y a pas eu de contamination accidentelle des échantillons testés.

Les contrôles et témoins à produire permettant de garantir la fiabilité des résultats au cours de l'analyse sont *a minima* les suivants :

- Un contrôle positif de processus : il devra contenir l'organisme cible. Il subira toutes les phases de l'analyse à partir de la phase d'extraction. Il est composé d'un macérat d'une matrice donnée artificiellement contaminé avec une suspension bactérienne lysée. Il permet de contrôler la qualité de la manipulation ainsi que le bon fonctionnement du matériel. Si une série d'analyses comporte des échantillons d'espèces végétales différentes, réaliser si possible un contrôle positif de processus par espèce végétale, ou au moins un par genre botanique. Ce contrôle positif est composé d'un volume de 250 µL de macérat d'une matrice donnée auxquels sont ajoutés 5 µL de suspension bactérienne lysée d'une souche de *X. fastidiosa* de référence (par exemple subsp. *fastidiosa* CFBP7970 / ATCC35879). La suspension bactérienne initiale doit être préparée de sorte à obtenir une concentration finale de l'ordre de  $10^5$  bactéries / mL. Ce contrôle permet également de mettre en évidence d'éventuelles inhibitions.
- Un contrôle négatif de processus : il sera préparé pour chaque série d'extractions. 250 µL d'eau de qualité analytique stérile subiront donc toutes les phases de l'analyse dès la mise en sachet et macération, pour vérifier l'absence de contamination lors de la phase d'extraction d'ADN. Il sera testé lors de chaque réaction de PCR en temps réel pour vérifier l'absence de contamination croisée entre échantillons ou de contamination externe lors de la phase d'extraction d'ADN.
- Un contrôle positif de PCR (ou témoin positif d'amplification) sera systématiquement introduit lors de chaque réaction de PCR en temps réel. Une prise d'échantillon composée d'une solution d'acides nucléiques cibles (ex : lysat bactérien) subira donc toutes les phases de l'analyse à partir de la préparation du mélange réactionnel de PCR afin de vérifier la qualité de l'amplification ainsi que la qualité de la manipulation et le bon fonctionnement du matériel.
- Un contrôle négatif de PCR (ou témoin négatif d'amplification) sera systématiquement introduit lors de chaque réaction de PCR en temps réel. Une prise d'échantillon " eau ultra pure " subira donc toutes les phases de l'analyse à partir de la préparation du mélange réactionnel de PCR pour vérifier l'absence de contamination lors de cette phase.

Ces témoins sont ensuite traités à l'identique des autres échantillons. La duplication des extractions d'ADN et des dépôts d'ADN pour amplification n'est pas requise pour les contrôles.

Ces contrôles ainsi que des contrôles supplémentaires que le laboratoire peut ajouter si nécessaire sont définis par la MOA022.



En cas d'anomalies constatées sur un contrôle, les dispositions de la MOA022 doivent être respectées.

## 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.

L'agencement et l'équipement des zones de travail sont définis dans la MOA 022 version en vigueur. Les matériels utilisés dans la méthode doivent satisfaire aux exigences de la MOA 022 version en vigueur.

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

Grandeur	EMT
Volume	EMT définies par la MOA022 version en vigueur
Masse	EMT = $\pm 10\%$
Température	Thermobloc, bain à sec : EMT = $\pm 5^{\circ}\text{C}$ Réfrigérateur : $5^{\circ}\text{C}$ et EMT = $\pm 4^{\circ}\text{C}$ (ou plus strict en fonction des recommandations fournisseur) Congélateur : $\leq -18^{\circ}\text{C}$ en fonction de l'usage

Tableau 1 : Erreurs maximales tolérées

Thermocycleur : le constat de qualification (aptitude à l'usage attendu) se fera sur la base des résultats obtenus par le biais d'un test biologique ou d'une vérification métrologique.

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

### Préparation des échantillons

- Agitateur orbital (pour la macération sous agitation des broyats)
- Balance de portée et d'exactitude adaptées à la pesée des échantillons (ex : balance de classe II)
- Pipette automatique (plage de mesure de 1 à 5 mL) et/ou distributeur
- Presse pneumatique (ou autre système de broyage pourvu qu'il permette d'obtenir une qualité de broyage équivalente et limite les risques de contaminations)
- Bain à ultrasons (sonicateur) (fréquence de 35 - 40 kHz)
- Petits équipements de laboratoire : ciseaux, pinces, scalpel, sécateur



### Extraction d'ADN selon le protocole QuickPick™

- Automate de type BioSprint 15 (Qiagen), KingFisher™ mL (Thermo Fisher Scientific), ou KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processors (Thermo Fisher Scientific), compatible avec le QuickPick™ SML Plant DNA Kit (Bio-Nobile).
- Agitateur de tubes de type Vortex
- Centrifugeuse permettant d'atteindre une force centrifuge relative d'environ 250 g à 20 000 g et rotor adapté pouvant recevoir des tubes plastiques de 1,5 et 2 mL
- Centrifugeuse de paillasse type « microspin »
- Pipettes automatiques (plage de mesure de 0,5 µL à 5 mL)
- Thermobloc ou bain-à-sec avec agitation (température 65°C) (pour la lyse cellulaire) ou enceinte thermostatique (température 65°C) + système d'agitation

### Extraction d'ADN selon le protocole CTAB

- Agitateur de tubes de type Vortex
- Centrifugeuse permettant d'atteindre une force centrifuge relative d'environ 250 g à 20 000 g et rotor adapté pouvant recevoir des tubes plastiques de 1,5 et 2 mL
- Pipettes automatiques (plage de mesure de 100 µL à 5 mL)
- Thermobloc ou bain-à-sec (température 65°C) (pour la lyse cellulaire)
- Hotte chimique ou sorbonne

### Equipement pour l'amplification

- Pipettes automatiques (plage de mesure de 0,5 µL à 1 mL)
- Appareil de PCR en temps réel et ordinateur de pilotage capables de mesurer la fluorescence du rapporteur FAM (méthode validée avec l'appareil C1000 Touch thermal cycler / Bloc CFX96 Real optics module BIORAD)

### Stockage des échantillons et des ADN

- Congélateur (température ≤ -18°C)
- Réfrigérateur (température = 5°C)





## 7. Échantillons

### 7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

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

- La méthode ne s'applique pas sur végétaux en dormance (ex : bouture, plante à feuilles caduques en repos végétatif).
- Les échantillons reçus pour analyse doivent être dans un bon état de conservation, c'est-à-dire, ni desséchés, ni en cours de décomposition. Le temps entre le prélèvement et l'arrivée au laboratoire doit être le plus réduit possible. Si les échantillons ne sont pas envoyés le jour même, ils doivent être conservés au froid avant l'envoi.
- Chaque échantillon est conditionné individuellement dans un emballage hermétique et parfaitement identifié (référence figurant sur la fiche de demande d'analyse). Toutes les mesures doivent être prises pour conserver l'intégrité de l'échantillon et éviter les contaminations par d'autres échantillons.
- Taille de l'échantillon suffisante pour réaliser les prélèvements nécessaires.
- Présence d'une fiche de demande d'analyse unique par échantillon : formulation claire de la demande, identification du végétal, de l'expéditeur, référence des échantillons, demande de confirmation auprès du LNR... Cette fiche est fixée à l'extérieur du colis.

Dans les cas contraires (échantillon en quantité insuffisante (cf. §8.1), échantillon dégradé), 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 maximum entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse doit être inférieur à 7 jours calendaires pour des échantillons prélevés dans de bonnes conditions.

En attente de traitement, l'échantillon devra être conservé à 5°C.

**Si l'échantillon ne peut pas être traité en intégralité dès sa réception, il est néanmoins obligatoire de démarrer l'analyse et de la stopper à l'une des étapes le permettant (cf. §8).**

### 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 (échantillon, macérat, extrait d'ADN) doit être conservé pendant une durée minimale de 12 mois, sauf pour les parties éventuellement transmises à un autre laboratoire agréé ou de référence, à qui est alors transférée la charge de conservation des reliquats.



Les conditions de conservation des différents types de reliquats d'échantillon à conserver en vue d'éventuelles analyses complémentaires sont présentées dans le tableau 2 ci-après :

Etapas	Type de reliquat	Conservation			Modalités d'envoi à un autre laboratoire le cas échéant
		Résultat	Durée	Conditions	
Prélèvement	Végétal	Négatif	15 jours après envoi du rapport	+5°C	Sachets individuels fermés et clairement identifiés Température ambiante Transporteur rapide
		Autre que négatif	12 mois	+5°C jusqu'à obtention du résultat (ou jusqu'à envoi au LNR) puis ≤-18°C	
Macération/ Broyage	Macérat/ Broyat végétal	Négatif	15 jours après envoi du rapport	+5°C jusqu'à obtention du résultat (ou jusqu'à envoi au LNR) puis ≤-18°C	Tubes / pots hermétiques clairement identifiés Température ambiante Transporteur rapide
		Autre que négatif	12 mois	≤-18°C	
Extraction d'ADN	Extraits d'ADN	Négatif	15 jours après envoi du rapport	+5°C ou ≤-18°C jusqu'à obtention du résultat puis ≤-18°C	Tubes hermétiques clairement identifiés Température ambiante Transporteur rapide
		Autre que négatif	12 mois		

Tableau 2 : conditions de conservation des échantillons



## 8. Mode opératoire

Le laboratoire doit mettre en place une procédure adaptée 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 (=prélèvement)

Le prélèvement peut être constitué de :

- - pétioles et nervures centrales,
- - rameaux non ligneux ou tiges
- - tissus vasculaires de rameaux ligneux (xylème).

Un prélèvement peut être composé d'un ou de plusieurs types des tissus listés ci-dessus (exemple : un échantillon peut être composé d'un mélange de pétioles et de tronçons de rameaux non ligneux).

Dans tous les cas, au minimum **1 g** de matériel végétal est prélevé.

Si l'échantillon est symptomatique, réaliser le prélèvement sur les organes présentant des brûlures foliaires et/ou des chloroses et/ou dessèchements.

- Pour les espèces végétales à pétioles de grande dimension (ex : caféiers, mûrier, vigne, ...), le prélèvement s'effectue sur feuilles, rameaux ou tiges différents (minimum 5 feuilles).
- Pour les espèces végétales à pétioles de petite dimension (ex : polygales, olivier, ...) ou sans pétiole et à petite nervure centrale (ex : romarin, ...), le prélèvement s'effectue sur feuilles, rameaux ou tiges différentes (minimum 25 feuilles).

En l'absence de symptôme, de mars à juillet, pour les *Prunus* spp. à feuilles caduques, il est recommandé de prélever les tissus vasculaires des rameaux ligneux (xylème). Il est possible de prélever ces fragments de xylème après avoir préalablement retiré l'écorce au scalpel.

**Ce prélèvement correspond à l'échantillon pour analyse.**

Pour la pesée des échantillons, les intervalles de pesée présentés dans le tableau 3 ci-après doivent être appliqués (règle des 5%) :

Exemple :

Masse minimale	Masse cible	Masse maximale
0,95 g ≤	1,0 g	< 1,05 g

Tableau 3 : intervalles de pesée

- Les échantillons sont à manipuler avec des gants (désinfecter les gants avec une solution d'hypochlorite de sodium ou produit équivalent, ou les remplacer, entre chaque échantillon).



- Nettoyer l'échantillon, si celui-ci est sale (terre, poussière, résidus cupriques, etc...) à l'aide d'un papier absorbant ou de coton, imbibé d'éthanol à 70 % vol ou d'eau.
- Découper les pétioles, les nervures centrales, les fragments de rameaux, de tiges ou de xylème en tronçons de quelques millimètres à l'aide d'un scalpel ou ciseaux préalablement désinfecté(s).
- Sur espèces avec gros pétioles, la base du pétiole est coupée afin d'éliminer, le cas échéant, la partie desséchée / oxydée avant de réaliser le prélèvement pour analyse.
- Réaliser la pesée du prélèvement selon les prescriptions présentées ci-avant.
- Entre chaque échantillon, changer les coupelles de pesée, et nettoyer la paillasse avec de l'hypochlorite de sodium ou un produit similaire afin d'éviter les contaminations croisées (destruction des traces d'ADN) et désinfecter les petits matériels de prélèvement, scalpels, ciseaux, sécateurs, etc., par trempage d'une durée d'au moins 2 minutes dans une solution d'hypochlorite de sodium d'une concentration d'au moins 2,6 % de chlore actif puis rincés abondamment à l'eau déminéralisée (élimination des traces d'ADN).
- Déposer le prélèvement dans un sac de broyage en plastique (avec gaze pour la filtration des particules grossières).

**Il est possible d'arrêter momentanément l'analyse à ce stade en conservant les prélèvements au réfrigérateur pendant 24 h ou au congélateur pour une durée supérieure à 24 h.**

- Ajouter 5 mL d'eau déminéralisée stérile par gramme d'échantillon.
- Ecraser grossièrement les tissus à l'aide d'un broyeur pneumatique (ou de tout autre équipement adapté) afin d'éclater les vaisseaux.
- Réaliser la sonication des sacs de broyage dans un bain à ultrasons à une fréquence d'environ 35-40 kHz durant 1 min environ. Plusieurs sachets peuvent être soumis à la sonication en même temps sous réserve qu'ils ne se touchent pas. Les sachets ne doivent pas être en contact avec le fond ou les parois de la cuve.
- Laisser macérer sous agitation environ 15 minutes à température ambiante.

Remarque : Certaines espèces végétales (par exemple *Juniperus* sp., *Lagerstroemia* sp., *Myrtus communis*, espèces appartenant à la famille des *Malvaceae*,...) peuvent présenter un aspect gélatineux.

Les macérats obtenus doivent être conservés à 5°C et analysés dans les 24 heures.

**Il est également possible d'arrêter momentanément l'analyse à ce stade en conservant les macérats au congélateur.**

- Préparer un sac avec de l'eau déminéralisée stérile pour le contrôle négatif de processus.

Pour éviter toute contamination croisée potentielle, toutes les mesures de destruction des ADN doivent être prises entre chaque manipulation d'échantillons.



## 8.2 Extraction de l'ADN total

### 8.2.1 Protocole QuickPick™ pour matrices autres qu'oliviers et chênes.

Ce protocole nécessite l'appareil BioSprint15 (Qiagen), KingFisher™ mL (Thermo Fisher Scientific) ou KingFisher™ Flex (Thermo Fisher Scientific) ainsi que les barrettes ou microplaques et capuchons plastiques décrits au point 5.6.

Ce protocole nécessite les composants du kit QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile) présentés dans le tableau 4 ci-après :

Reagent:	8 preps	24 preps	96 preps
Plant DNA Magnetic Particles <sup>(1)</sup>	40 µl	170 µl	540 µl
Plant DNA Proteinase K solution	40 µl	250 µl	700 µl
Plant DNA Lysis Buffer	600 µl	3.2 ml	8.5 ml
Plant DNA Binding Buffer <sup>(2)</sup>	1 ml	4.25 ml	13.5 ml
Plant DNA Wash Buffer <sup>(2)</sup>	6 ml 22 ml	2 x 40 ml	
Plant DNA Elution Buffer	1 ml	7 ml	22 ml

Reagents contain 0.02% NaN<sub>3</sub>.

Tableau 4 : composants du kit QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile)

**Deux prises d'essai sont réalisées par échantillon (prélèvement), que celui-ci soit symptomatique ou asymptomatique.**

- Mettre en chauffe le thermobloc ou le bain-à-sec à 65°C.
- Prélever 2 fois 250 µL de macérat (tel que préparé au point 8.1) et les déposer dans 2 tubes de 2 mL.
- Introduire à ce stade, le ou les contrôle(s) positif(s) de processus (voir paragraphe 5.7).
- Centrifuger environ 20 minutes à environ 20 000 g à température ambiante.
- Jeter le surnageant.

**Il est possible d'arrêter momentanément l'analyse à ce stade durant plusieurs jours en conservant les prélèvements au congélateur.**

- Reprendre le culot avec 75 µL de tampon de lyse et 5 µL de protéinase K. Vortexer ou si nécessaire suspendre le culot avec une pipette par aspiration /refoulement (il est possible de reprendre le culot avec 80 µL d'une solution en mélange de protéinase K (5 µL) et de tampon de lyse (75 µL) préparée extemporanément).
- Incuber environ 20 minutes à 65°C avec agitation régulière (utilisation par exemple d'un thermobloc à agitation ou utilisation d'un agitateur de type Vortex toutes les 5 minutes environ).

Un contrôle de processus négatif et un contrôle positif de processus sont insérés dans chaque série lors de l'utilisation de l'automate.



## Mode opératoire spécifique aux appareils BioSprint15 (Qiagen), KingFisher™ mL (Thermo Fisher Scientific)

### Préparation des barrettes

- Remettre les billes magnétiques en suspension par agitation manuelle et/ou pipetage (ne pas vortexer).
- Disposer les barrettes (1 mL) sur le plateau de l'automate.
- Disposer les peignes sur les aimants dans l'automate, en veillant au sens et à l'alignement.
- Déposer les solutions tampons dans les puits des barrettes, selon le schéma 1 suivant :

Etape	Binding		Wash 1	Wash 2	Wash 3	Elution
Côté gauche = languette	A		B	C	D	E
Tampon	Binding buffer	Magnetic particles	Wash buffer	Wash buffer	Wash buffer	Elution buffer
Volume (µL)	125	5	250	250	250	50

Schéma 1 : plan de dépôt des solutions tampons

### Extraction et élution de l'ADN

- Centrifuger les lysats environ 5 min à environ 18 000 g à température ambiante.
- Reprendre la totalité du surnageant (env. 80 µL) et le déposer dans le puits A de la barrette, mettre le plateau dans l'appareil.
- Allumer l'automate et démarrer le programme spécifique (durée environ 31 minutes). Le programme est décrit en annexe 1 ou 2 selon l'automate utilisé.

### Transfert final de l'ADN

- Sortir le plateau et transférer si besoin l'ADN dans un nouveau tube. Vérifier l'absence de reliquat de microbilles en positionnant les barrettes d'éluats sur un aimant. La solution d'ADN est alors prête à l'emploi. Il est possible de stocker la solution d'ADN plusieurs jours au réfrigérateur avant analyse, ou au congélateur pour une conservation sur plusieurs semaines ou plusieurs mois.

## Mode opératoire spécifique à l'appareil KingFisher™ Flex (Thermo Fisher Scientific)

Dans ce cas il n'est pas utilisé de barrettes mais des plaques 96 puits. Les volumes déposés sont identiques. A chacune des différentes étapes : binding / lavage 1 / lavage 2 / lavage 3 / élution, correspond une plaque. L'ensemble des puits utilisés d'une plaque 96 est donc rempli avec le tampon ou mélange correspondant à l'étape. Pour les étapes binding / lavage 1 / lavage 2 / lavage 3, les plaques utilisées sont les « KingFisher 96 Deepwell plates ». Pour l'étape d'élution, utiliser les « KingFisher 96 plates ». Avec cet automate, le transfert des éluats est réalisé automatiquement.

Le programme spécifique (durée environ 31 minutes) est décrit en annexe 3.



### 8.2.2 Protocole CTAB pour matrices olivier et chêne.

***Deux prises d'essai sont réalisées par échantillon (prélèvement), que celui-ci soit symptomatique ou asymptomatique.***

- Prélever 2 fois 1 mL de macérat et les transférer dans 2 microtubes de 2 mL.
- Centrifuger à environ 20 000 g pendant environ 20 min et ôter le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 1 mL de tampon CTAB (voir annexe 4) puis réaliser la lyse à environ 65°C pendant 30 min environ.
- Centrifuger à environ 16 000 g pendant 5 min environ.
- Transférer 1 mL de surnageant dans un nouveau tube de 2 mL en faisant attention de ne pas prélever de débris végétaux.
- Ajouter 1mL de chloroforme : alcool iso amylique (24 :1) et vortexer.
- Centrifuger à environ 16 000 g pendant 10 min environ.
- Transférer 700 µL (soit la totalité du surnageant) dans un tube de 1,5 mL et ajouter 490 µL de 2-propanol (isopropanol) conservé à une température  $\leq -18^{\circ}\text{C}$ . Mélanger plusieurs fois par retournement du tube jusqu'à homogénéisation
- Incuber à une température  $\leq -18^{\circ}\text{C}$  pendant au minimum 20 min.
- Centrifuger à environ 16 000 g pendant 20 min environ.
- Enlever le surnageant (par renversement du tube)
- Ajouter 1mL d'éthanol 70% conservé à une température  $\leq -18^{\circ}\text{C}$  sans resuspendre le culot.
- Centrifuger à environ 16 000 g pendant 10 min environ.
- Retirer tout le surnageant par retournement du tube en prenant soin de ne pas décrocher le culot (difficilement visible).
- Laisser sécher le culot tube ouvert pendant 45 à 60 minutes environ à une température inférieure à 40°C.
- Ajouter 100 µL d'eau ultrapure et resuspendre le culot par agitation au Vortex après avoir laissé le culot s'hydrater au minimum 1h.

**Il est possible de stocker la solution d'ADN plusieurs jours au réfrigérateur avant analyse, puis au congélateur pendant plusieurs mois.**



### 8.3 Test de détection par PCR en temps réel

Pour chaque solution mère d'ADN extrait, deux amplifications doivent être réalisées.

Pour chaque série d'amplification, réaliser un témoin négatif d'amplification et un témoin positif d'amplification tel que décrit au point 5.7.

La composition du mélange réactionnel pour une réaction est présentée dans le tableau 5 ci-après. Elle diffère selon l'espèce végétale et selon la méthode d'extraction d'ADN mise en œuvre.

#### 8.3.1 Conditions d'amplification A après extraction d'ADN au CTAB sur olivier et chênes

Réactifs	Concentration finale ou volume final
Eau ultra pure	qsp 16 $\mu$ L
TaqMan™ Fast Universal Master Mix (2X), no AmpErase™ UNG (Applied Biosystems)	1 X
Amorce sens XF-F	0,3 $\mu$ M
Amorce antisens XF-R	0,3 $\mu$ M
Sonde XF-P	0,1 $\mu$ M
BSA	0,3 $\mu$ g/ $\mu$ L
Mélange réactionnel	16 $\mu$ L
Extrait d'ADN	<b>4 <math>\mu</math>L</b>
Volume final	20 $\mu$ L

Tableau 5 : composition du mélange réactionnel pour amplification par PCR en temps réel Harper (Harper *et al.*, 2010) de l'ADN extrait avec la méthode CTAB d'olivier (*Olea europaea*) et de chênes (*Quercus* spp.)





### 8.3.2 Conditions d'amplification B après extraction d'ADN avec le kit QuickPick™ sur matrices autres qu'olivier et chênes

Réactifs	Concentration finale ou volume final
Eau ultra pure	qsp 18 µL
TaqMan™ Fast Universal Master Mix (2X), no AmpErase™ UNG (Applied Biosystems)	1 X
Amorce sens XF-F	0,3 µM
Amorce antisens XF-R	0,3 µM
Sonde XF-P	0,1 µM
BSA non acétylée	0,3 µg/µL
Mélange réactionnel	18 µL
Extrait d'ADN	<b>2 µL</b>
Volume final	20 µL

Tableau 6 : composition du mélange réactionnel pour amplification par PCR en temps réel Harper (Harper *et al.*, 2010) de l'ADN extrait avec le kit QuickPick™ pour des matrices autres qu'olivier (*Olea europaea*) et chênes (*Quercus* spp.)



Les différents paramètres de l'amplification par PCR en temps réel pour la détection de *X. fastidiosa* sont présentés dans le tableau 6 ci-après:

Etape	Température	Durée programmée	Nombre de cycle
Activation de l'ADN polymérase	50°C	2 min	1
	95°C	10 min	
Dénaturation	94°C	10 s	40
Hybridation / Elongation (mesure de la fluorescence à la fin de chaque cycle)	62°C	40 s	

Tableau 7 : paramètres d'amplification



## 9. Résultats

### 9.1 Contrôle de la validité des résultats

**Une valeur de Ct doit être accompagnée d'une courbe de type exponentiel (en échelle linéaire et exponentielle) 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 contrôle négatif de processus et le témoin négatif d'amplification n'ont pas généré de courbe de fluorescence caractéristique, ni de valeur de Ct, ou bien une valeur de Ct > à 38. Ils permettent de vérifier l'absence de contamination croisée accidentelle.
- Le contrôle positif de processus et le témoin positif d'amplification ont généré une courbe de fluorescence de type exponentielle et une valeur de Ct  $\leq$  à 38.

Le contrôle positif de processus permet de détecter de fortes concentrations en inhibiteurs de PCR. Le témoin positif d'amplification permet de vérifier la qualité des réactifs PCR et les paramètres d'amplification.

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

Dans le cas où le contrôle positif de processus a généré une courbe de fluorescence de type non exponentielle et/ou une valeur de Ct > à 38, l'amplification devra être réitérée pour les échantillons concernés sur les extraits d'ADN dilués au 10<sup>ème</sup> dans de l'eau ultra pure.

### 9.2 Calculs et expression des résultats

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

La publication Harper *et al.* 2010, Erratum 2013 précise que le cut-off de la méthode est 38. Les règles d'interprétation des résultats de chaque réplicat sont présentées dans le tableau 7 ci-après :

Valeur de Ct obtenue pour le réplicat	Statut du réplicat
Ct $\leq$ 38	Positif
Ct > 38	Négatif

Tableau 8 : règle de cut-off applicables

Pour chaque échantillon analysé, les résultats des deux prises d'essai, par exemple référencées 'A' et 'B', sont interprétés en parallèle. L'interprétation détaillée en fonction des résultats de chaque réplicat des extraits d'ADN est présentée dans le tableau 8 ci-après :



Type résultat	Résultat sur prise d'essai A	Résultat sur prise d'essai B	Résultat final	Marche à suivre	Interprétation / marche à suivre / Expression des résultats
1	+/+	+/+	<i>X.fastidiosa</i> détecté	Sans objet	<i>X.fastidiosa</i> détecté
2	+/+	+/-	<i>X.fastidiosa</i> détecté	Sans objet	<i>X.fastidiosa</i> détecté
3	+/+	-/-	<i>X.fastidiosa</i> détecté	Sans objet	<i>X.fastidiosa</i> détecté
4	+/-	+/-	Non déterminé	PCR à refaire	Suite à la nouvelle PCR : si résultat 1, 2, 3 ou 4 : <i>X.fastidiosa</i> détecté ; si résultat 5: extraction à renouveler (2 prises d'essais par échantillon). si 6: <i>X.fastidiosa</i> non détecté  Suite à la nouvelle extraction : si résultat 1, 2, 3 ou 4 : <i>X.fastidiosa</i> détecté ; si résultat 5 ou 6 : <i>X.fastidiosa</i> non détecté
5	+/-	-/-	Non déterminé	PCR à refaire	
6	-/-	-/-	<i>X.fastidiosa</i> non détecté	Sans objet	<i>X.fastidiosa</i> non détecté

Tableau 9 : interprétation des résultats

Ce tableau décisionnel est également valable en cas d'introduction de dilution au 1/10<sup>ème</sup> de l'extrait d'ADN. Ainsi, en présence d'inhibiteurs (renouvellement de l'amplification), l'interprétation est réalisée soit sur la série des 4 extraits dilués soit sur la série des 4 extraits non dilués. La série choisie est celle amenant au nombre maximum de positif(s).

Remarque : l'extraction d'ADN pourra également être renouvelée sur décision du laboratoire.

#### Expression des résultats sur le rapport d'analyse

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

La référence de la méthode d'analyse utilisée sera mentionnée, par exemple: « Détection de *Xylella fastidiosa* par PCR en temps réel sur végétal- méthode MA039 ».



## 10. Caractéristiques de performance de la méthode

La synthèse des caractéristiques de performance de la méthode présentée dans le tableau ci-après est extraite :

- - de la version 1 du rapport de caractérisation et de validation d'une méthode d'analyse MA039 version 1 « Détection de *Xylella fastidiosa* par PCR en temps réel sur plantes hôtes » établi par le LNR en mai 2016 (**A**).
- - de la version 1 du rapport de caractérisation et de validation d'une méthode d'analyse MA039 version 4 « Détection de *Xylella fastidiosa* par PCR en temps réel sur végétal » établi par le LNR en janvier 2019 (**B**).

### Résultats sur souches pures (**A et B**)

Critères de performance	Valeur obtenue	Principales informations relatives aux modalités de réalisation de la caractérisation
Inclusivité	100%	<p><b>(A)</b> 19 souches <u>cibles</u> appartenant aux sous-espèces <i>X.f.</i> subsp. <i>fastidiosa</i>, <i>X.f.</i> subsp. <i>pauca</i>, <i>X.f.</i> subsp. <i>sandyi</i>, <i>X.f.</i> subsp. <i>multiplex</i>.</p> <p><b>(B)</b> 55 souches <u>cibles</u> appartenant aux sous-espèces <i>X.f.</i> subsp. <i>fastidiosa</i>, <i>X.f.</i> subsp. <i>morus</i>, <i>X.f.</i> subsp. <i>pauca</i> et <i>X.f.</i> subsp. <i>multiplex</i>.</p>
Exclusivité	100%	29 souches <u>non-cibles</u> : 16 <i>Xanthomonas</i> sp., 1 <i>Xylophilus ampelinus</i> , 1 <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> , 1 <i>Ca. L. Africanus</i> , 6 bactéries saprophytes sur <i>Coffea</i> spp. et 4 bactéries saprophytes sur <i>Citrus sinensis</i> .

Tableau 10 : valeurs des critères de performance sur souches pures



### Résultats sur macérâts d'olivier et de chêne artificiellement contaminés (validation intra-laboratoire) (B : MA039 version 4)

Les essais ont été réalisés pour les échantillons de statut connu positif sur des macérâts artificiellement contaminés par des gammes de dilution au 1/10<sup>ème</sup> de suspensions bactériennes (souche *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* LNPV 24.34 (CFBP 7970)) présentant des concentrations allant de **10<sup>3</sup> à 10<sup>6</sup> bact./mL** de macérât.

Sur des matrices connues pour leur taux d'inhibiteurs de PCR élevé, ont été utilisés pour la matrice olivier, 4 échantillons provenant de 3 oliviers différents et un oléâtre et pour la matrice chêne vert, 2 échantillons provenant de 2 arbres différents.

Trois extractions ont été réalisées pour chaque couple matrice/concentration bactérienne et 3 amplifications ont été réalisées par extraction.

Les essais ont été réitérés 3 fois sur 3 jours différents.

### **Extraction d'ADN avec kit QuickPick™ (A : MA039 version 1)**

Caractéristique de performance	Matrice	Valeur obtenue à l'issue de la caractérisation
Seuil de détection (avec taux de détection de 100%)	Oranger ( <i>Citrus sinensis</i> )	3.10 <sup>2</sup> bact./mL
	Vigne ( <i>Vitis vinifera</i> )	1.10 <sup>3</sup> bact./mL
Sélectivité au-dessus du seuil de détection		100%
Spécificité	Oranger ( <i>Citrus sinensis</i> )	100%
Exactitude	Vigne ( <i>Vitis vinifera</i> )	100%
Répétabilité		100%
Reproductibilité		100%

Tableau 11 : Valeurs des critères de performance après extraction d'ADN avec le kit QuickPick™ (A : MA039 version 1), modalité d'amplification B et cut-off unique à 38



### Extraction avec protocole CTAB (B : MA039 version 4)

Caractéristique de performance	Matrice	Valeur obtenue à l'issue de la caractérisation
Seuil de détection (avec taux de détection de 100%)	Oliviers ( <i>Olea europaea</i> incluant var <i>sylvestris</i> )	1.10 <sup>4</sup> bact./mL
	Chênes verts ( <i>Quercus ilex</i> )	1.10 <sup>3</sup> bact./mL
Sélectivité au-dessus du seuil de détection	Oliviers ( <i>Olea europaea</i> incluant var <i>sylvestris</i> ) et chênes verts ( <i>Quercus ilex</i> )	100%
Spécificité		100%
Exactitude		100%
Répétabilité		100%
Reproductibilité		100%

Tableau 12 : valeurs des critères de performance après extraction d'ADN avec le protocole CTAB (B : MA039 version 4), modalité d'amplification A et cut-off unique à 38



## Annexe 1 Programme d'extraction pour l'automate KingFisher™ mL (Thermo Fisher Scientific) automate pour le kit QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile)

### [ PLATE LAYOUTS ]

---

#### Default

Plate type = 5-tube strip (1 ml)  
Plate change message = Change Default

#### A:

- volume = 80, name = Lysat
- volume = 5, name = magnetic particules
- volume = 125, name = binding buffer

#### B:

- volume = 250, name = Wash buffer

#### C:

- volume = 250, name = Wash buffer

#### D:

- volume = 250, name = Wash Buffer

#### E:

- volume = 50, name = Elution Buffer

### [ STEPS ]

---

#### BIND

##### Step parameters

- Name = Binding
- Well = A, Default

##### Beginning of step:

- No Action = Yes

##### Bind parameters:

- Bind time = 10min 0s, speed = Medium

##### End of step:

- Collect beads = Yes, count = 5
- Collect time [s]                      10

---

#### WASH

##### Step parameters





- Name = Wash 1
- Well = B, Default

**Beginning of step:**

- Release = Yes, time = 10s, speed = Medium

**Wash parameters:**

- Wash time = 20s, speed = Medium

**End of step:**

- Collect beads = Yes, count = 5
  - Collect time [s]            10
- 

**WASH**

**Step parameters**

- Name = Wash 2
- Well = C, Default

**Beginning of step:**

- Release = Yes, time = 10s, speed = Medium

**Wash parameters:**

- Wash time = 20s, speed = Medium

**End of step:**

- Collect beads = Yes, count = 5
  - Collect time [s]            10
- 

**WASH**

**Step parameters**

- Name = Wash 3
- Well = D, Default

**Beginning of step:**

- Release = Yes, time = 10s, speed = Medium

**Wash parameters:**



- Wash time = 20s, speed = Medium

**End of step:**

- Collect beads = Yes, count = 5
- Collect time [s]            10

---

**ELUTION**

**Step parameters**

- Name = Elution
- Well = E, Default

**Beginning of step:**

- Release = Yes, time = 10s, speed = Medium

**Elution parameters:**

- Elution time = 10min 0s, speed = Slow

**Pause parameters:**

- Pause for manual handling = No

**Remove beads:**

- Remove beads = Yes, collect count = 5, disposal well = D

*Nota bene* : si nécessaire, le script informatique du programme est disponible auprès du LNR. Ne pas utiliser de version du logiciel BindIt antérieure à la version 3.2.



## Annexe 2 Programme d'extraction pour l'automate KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processors (Thermo Fisher Scientific) automate pour le kit QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile)

### Reagent info

Tip Comb KingFisher 96 KF plate

Name Well volume [μl] Total reagent volume [μl] Type

#### Elution KingFisher 96 KF plate

Name Well volume [μl] Total reagent volume [μl] Type

Elution buffer 50 Reagent

#### Binding Microtiter DW 96 plate

Name Well volume [μl] Total reagent volume [μl] Type

Lysat 80 - Reagent

magnetic particles 5 Reagent

binding buffer 125 Reagent

#### Wash1 Microtiter DW 96 plate

Name Well volume [μl] Total reagent volume [μl] Type

Wash buffer 250 Reagent

#### Wash 2 Microtiter DW 96 plate

Name Well volume [μl] Total reagent volume [μl] Type

Wash Buffer 250 Reagent

#### Wash 3 Microtiter DW 96 plate

Name Well volume [μl] Total reagent volume [μl] Type

Wash Buffer 250 Reagent

### Steps data

Tip1 96 DW tip comb

Pick-Up Tip Comb

**Binding** Binding

Beginning of step Precollect No

Release beads Yes

Mixing / heating: Mixing time, speed 00:10:00, Medium



		Heating during mixing	No
End of step	Postmix	No	
		Collect count	5
		Collect time [s]	10
<b>Wash1</b>		Wash1	
Beginning of step	Precollect	No	
		Release time, speed	00:00:10, Medium
Mixing / heating:		Mixing time, speed	00:00:20, Medium
		Heating during mixing	No
End of step	Postmix	No	
		Collect count	5
		Collect time [s]	10
<b>Wash2</b>		Wash 2	
Beginning of step	Precollect	No	
		Release time, speed	00:00:10, Medium
Mixing / heating:		Mixing time, speed	00:00:20, Medium
		Heating during mixing	No
End of step	Postmix	No	
		Collect count	5
		Collect time [s]	10
<b>Wash3</b>		Wash 3	
Beginning of step	Precollect	No	
		Release time, speed	00:00:10, Medium
Mixing / heating:		Mixing time, speed	00:00:20, Medium
		Heating during mixing	No
End of step	Postmix	No	
		Collect count	5
		Collect time [s]	10
<b>Elution</b>		Elution	
Beginning of step	Precollect	No	
		Release time, speed	00:00:10, Medium



Mixing / heating:	Mixing time, speed	00:10:00, Slow
	Heating during mixing	No
End of step	Postmix	No
	Collect count	5
	Collect time [s]	10

**Leave** Wash 3

*Nota bene* : si nécessaire, le script informatique du programme est disponible auprès du LNR. Ne pas utiliser de version du logiciel BindIt antérieure à la version 3.2.



## Annexe 3 : Réactifs extraction CTAB

Les recettes sont issues du protocole OEPP Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2019) 49 (2), 175-227 Diagnostic PM7/24 (4) *Xylella fastidiosa*.

### Tampon CTAB

Réactif	Quantité
Solution pour tampon CTAB	100 mL
Cethyl triméthylammonium bromide ou bromure d'hexadécyltriméthyl ammonium (CTAB)	2 g
Polyvinylpyrrolidone 40 ( PVP 40)	1 g

Dissolution du CTAB en chauffant à une température inférieure à 50°C (sur agitateur magnétique chauffant par exemple) avant ajout du PVP 40

Ne pas autoclaver

Conservation à 5°C +/- 4 ; date limite d'utilisation (DLU) : 7 jours

### Solution pour tampon CTAB

Réactif	Quantité
2-amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol, hydrochloride (Tris-HCl)	7,88 g
EDTA disodique dihydraté (Na <sub>2</sub> EDTA)	3,72 g
Chlorure de sodium (NaCl)	40,90 g
Eau déminéralisée	500 mL

Peser le Tris-HCl puis ajouter une partie des 500 mL d'eau déminéralisée (env. 100 mL) et dissoudre le Tris-HCl.

Ajuster à pH 8 ± 0,05 U

Après autoclavage, conservation à 5°C +/- 4 ; date limite d'utilisation (DLU) : 1 mois



## Bibliographie

Amanifar N., Taghavi M. , Izadpanah K. , Babaei G. , Isolation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa* from grapevine and almond in Iran, *Phytopathologia Mediterranea* (2014) 53, 2, 318–327.

EFSA, Update of the *Xylella* spp. host plant database, SCIENTIFIC REPORT, EFSA Journal 2018;16 (9)

Harper S.J., Ward LI and Clover GR., Development of LAMP and real-time PCR methods for the rapid detection of *Xylella fastidiosa* for quarantine and field applications, *Phytopathology*, 2010, 100(12): 1282-8; erratum 2013; 103(7):762.

Loconsole G., Potere O., Boscia D., Altamura G., Djelouah K., Elbeaino T., Frasher D., Lorusso D., Palmisano F., Pollastro P., Silletti M.R., Trisciuzzi N., Valentini F., Savino V. and Saponari M., Detection of *Xylella fastidiosa* in olive trees by molecular and serological methods, *Journal of Plant Pathology* (2014), 96 (1), 7-14.

OEPP Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2019) 49 (2), 175-227 Diagnostic PM7/24 (4) *Xylella fastidiosa*

Wells J.M., Raju B.C., Hung H-Y., Weisburg W.G., Mandelco-Paul L., Brenner D.J., *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov: Gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, April 1987 37: 136-143