

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/ LSV / MA 039 - version 6

En consultation

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

Laboratoire de la santé des végétaux

Laboratoire national de référence : Mandat « Autres bactéries »

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 $\leq -18^{\circ}\text{C}$ 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^{ème} 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>
V6*	Majeures		<p>Suppression de la restriction d'application de la MA039v6 à l'analyse sur végétaux en dormance (harmonisation avec le PM7/24 (4) OEPP)</p> <p>Introduction de la possibilité de réaliser des analyses sur échantillons composites (dans la limite de 10 plantes regroupées) sans modification du protocole d'extraction de l'ADN</p> <p>Introduction de la possibilité de réaliser des analyses sur échantillons composites (de 11 à 50 plantes regroupées) avec étape de concentration préalable à l'extraction de l'ADN</p> <p>Extraction d'ADN de l'échantillon végétal basée sur l'utilisation du kit Maxwell® HT Environmental TNA (Promega) en remplacement du protocole CTAB/chloroforme pour les matrices <i>Olea europaea</i> et <i>Quercus</i> spp. en vue d'améliorer le seuil de détection sur ces matrices, de supprimer l'utilisation du chloroforme présentant un risque pour la santé des opérateurs et d'automatiser le protocole</p> <p>Introduction d'un contrôle interne en duplexage (diminution du risque de contamination croisée) en remplacement du contrôle positif d'extraction.</p>

			Modification du programme d'amplification en vue d'une adéquation avec les caractéristiques techniques de l'enzyme utilisée. Réduction de la durée du programme d'amplification de 11 minutes environ Ajout du résultat de type « Indéterminé ».
--	--	--	---

*La version 6 a fait l'objet d'une consultation du **XX/XX/2022** au **XX/XX/2022** sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français

PROJET

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 « Autres bactéries »**

Adresse : 7 rue Jean Dixméras 49044 Angers CEDEX 01

Contact : lsv.ubvo@anses.fr

La méthode a été optimisée, évaluée et validée par l'équipe de bactériologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux mentionnée ci-dessus (rapport de caractérisation et de validation de la méthode MA039 version 6 en date du 08/11/ 2022).

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

Sommaire

Avant-propos	5
Introduction.....	8
Avertissements et précautions de sécurité	9
1. Objet et domaine d'application.....	10
2. Documents de référence.....	10
3. Termes, sigles et définitions	10
4. Principe de la méthode	11
5. Réactifs.....	13
5.1 Eau.....	13
5.2 Kit d'extraction d'ADN.....	13
5.3 Oligonucléotides.....	13
5.4 Kit de PCR en temps réel	14
5.5 Autres réactifs	14
5.6 Autres consommables à usage unique	14
5.7 Contrôles et témoins.....	15
6. Appareillage et matériels.....	16
7. Échantillons.....	18
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	18
7.2 Conservation des échantillons avant analyse	18
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse.....	18
8. Mode opératoire	20
8.1 Préparation des échantillons pour analyse (=prélèvement).....	20
8.2 Extraction de l'ADN total.....	23
8.2.1 Protocole QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile) pour matrices autres qu' <i>Olea europaea</i> et <i>Quercus</i> spp.....	23
8.2.2 Protocole Maxwell® HT Environmental TNA (Promega) pour matrices <i>Olea europaea</i> et <i>Quercus</i> spp.	25
8.3 Test de détection par PCR en temps réel duplex.....	26
8.3.1 Conditions d'amplification A après extraction d'ADN avec le kit Promega sur <i>Olea europaea</i> et <i>Quercus</i> spp.....	27
8.3.2 Conditions d'amplification B après extraction d'ADN avec le kit QuickPick™ sur matrices autres que <i>Olea europaea</i> et <i>Quercus</i> spp.	28
9. Résultats.....	607

9.1 Contrôle de la validité des résultats	30
9.2 Calculs et expression des résultats	30
10. Caractéristiques de performance de la méthode	33
Bibliographie.....	38
Annexe 1 Programme d'extraction pour l'automate KingFisher™ mL (Thermo Fisher Scientific) automate pour le kit QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile).....	39
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)	42
Annexe 3 : Programme d'extraction pour l'automate KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processors (Thermo Fisher Scientific) automate pour le kit Maxwell® HT Environmental TNA (Promega).....	45

Introduction

Xylella fastidiosa (Wells *et al.* 1987) est une bactérie phytopathogène réglementée dans l'Union européenne. Elle est définie comme organisme de quarantaine prioritaire dans l'Union européenne.

X. fastidiosa est une bactérie du xylème endémique du continent américain présente sur une large gamme d'hôtes. Trois sous-espèces majeures sont reconnues d'un point de vue taxonomique (*fastidiosa*, *multiplex* et *pauca*) (Yuan *et al.*, 2010) et deux autres ont été proposées (*morus* et *sandyi*). Ces sous-espèces sont plus ou moins inféodées à une gamme de plantes hôtes et une région géographique. La bactérie est transmise par des insectes piqueurs-suceurs du xylème. 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 présent en Europe du Sud, avec, en premier, 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. A partir de juillet 2015, la bactérie a été détectée sur le territoire corse, puis en région PACA (Var et Alpes-Maritimes) sur de nombreuses espèces végétales. Depuis octobre 2020, la région Occitanie (Aude, Tarn, Ariège, Haute-Garonne et Gard) présente des foyers.

De plus, depuis 2016, la présence de la bactérie a été notifiée en Allemagne (foyer éradiqué) et en Espagne (continentale et Baléares), puis au Portugal en 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 ou aucun en raison de causes biotiques ou abiotiques. La gamme d'hôtes de *X. fastidiosa* comprend plus de 660 espèces végétales appartenant à 88 familles botaniques différentes (EFSA, 2022).

La présente méthode a pour objet la détection par PCR en temps réel de la bactérie phytopathogène *X. fastidiosa* sur plantes, qu'elles soient symptomatiques ou non, dans le cadre de la surveillance officielle.

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'autorisation 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.

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*.
- Dans le cas d'une réponse négative pour la cible 18S (contrôle interne) et d'une réponse négative pour la cible *Xylella fastidiosa*, le statut de l'échantillon est considéré comme indéterminé.

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.

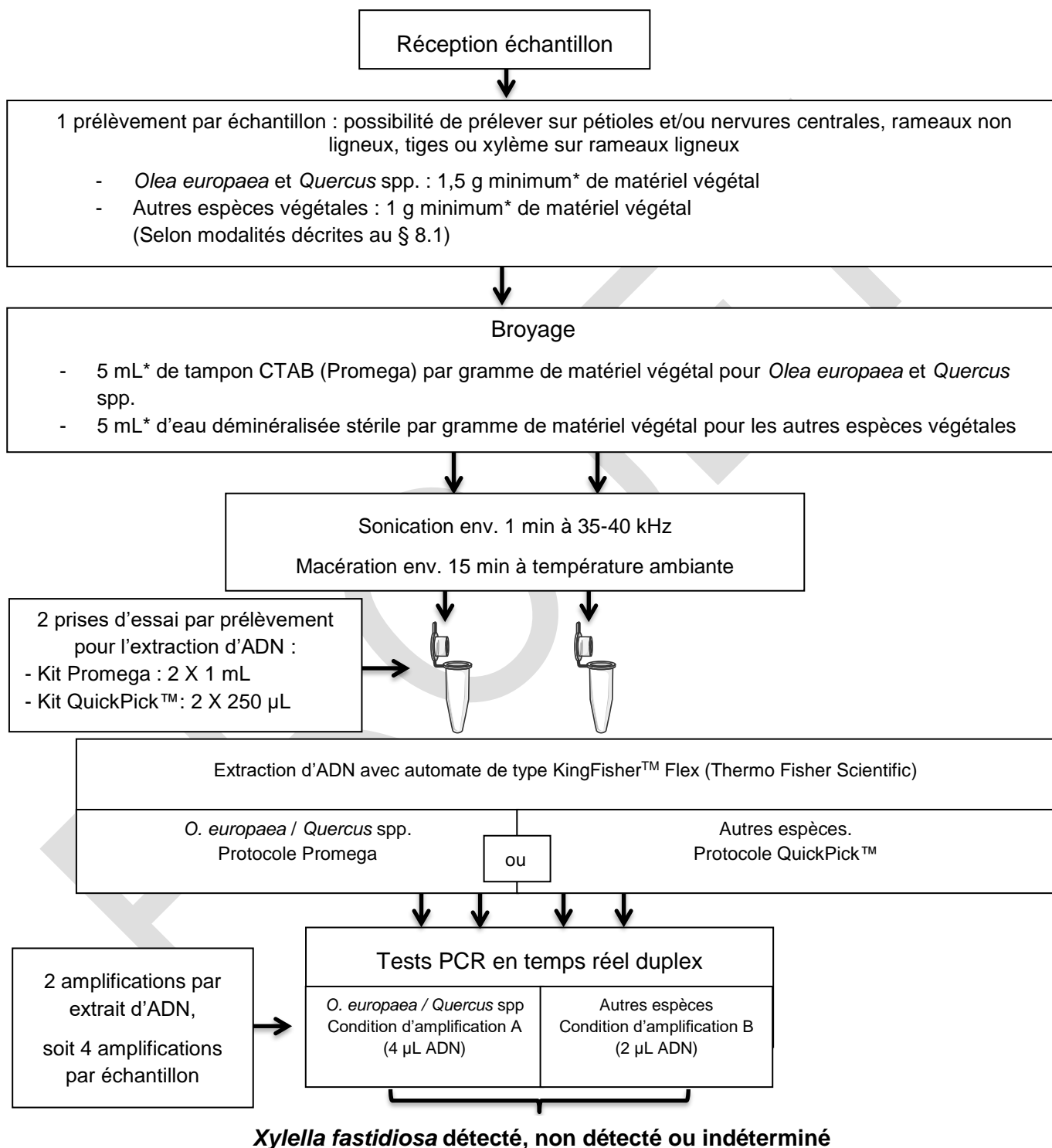
3. Termes, sigles et définitions

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.

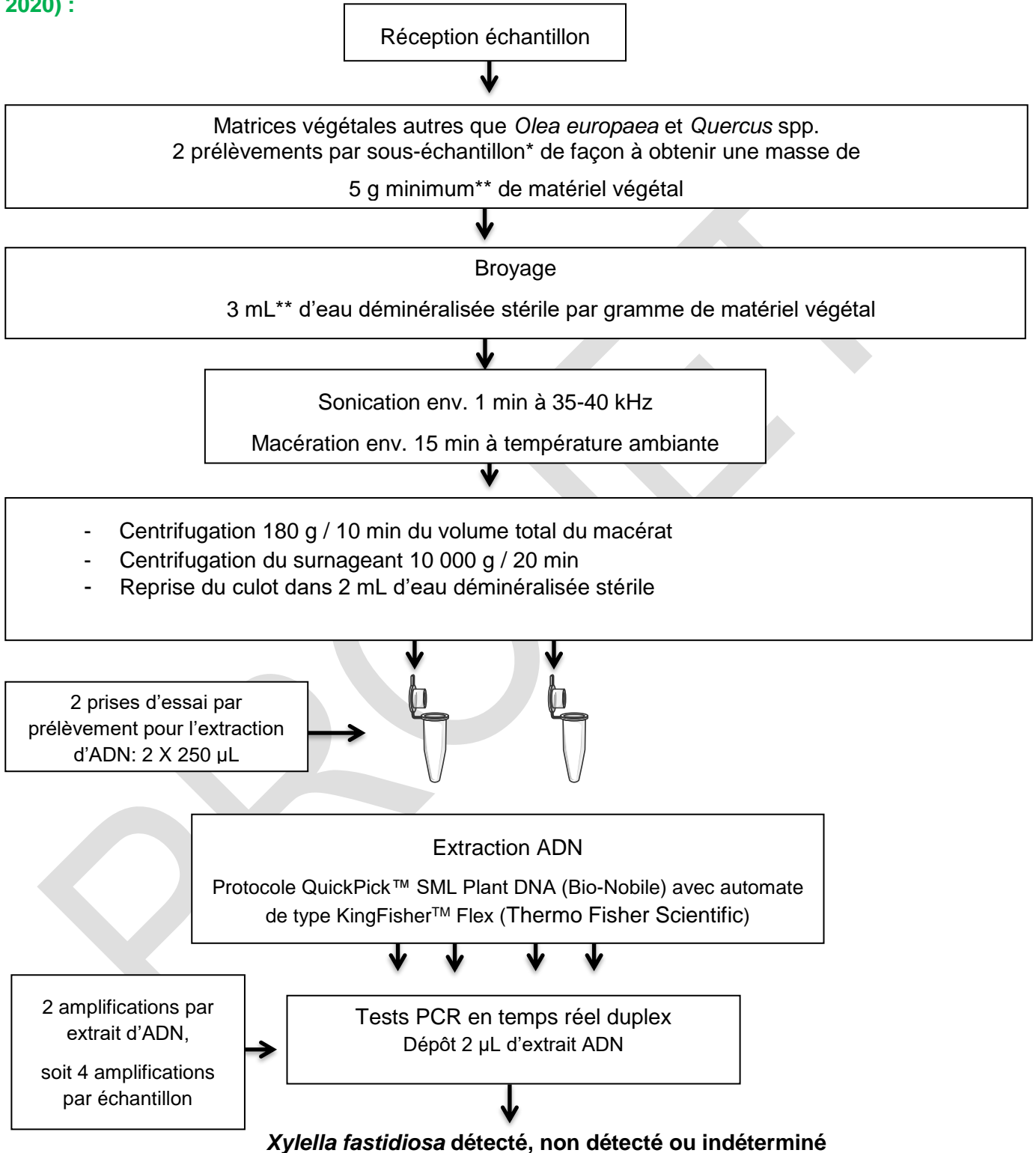
4. Principe de la méthode

Principe de la méthode pour échantillon isolé ou échantillon composite dans la limite de 10 prélèvements regroupés :



* En cas de masse supérieure, respecter le rapport volume/masse

Principe de la méthode pour échantillon composite de 11 à 50 échantillons regroupés (Anses 2020) :



* Dans le cadre d'un échantillon composite (pool), un sous-échantillon est un des échantillons individuels composant l'échantillon composite.

** 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

Le kit QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile) est utilisé pour les espèces végétales autres que *Olea europaea* et *Quercus spp.*

Le kit Maxwell® HT Environmental TNA (Promega réf.) est utilisé pour les espèces végétales *Olea europaea* et *Quercus spp.*

5.3 Oligonucléotides

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

Harper et al., 2010 erratum 2013

- 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)

Contrôle interne loos *et al.*, 2009

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

- 18S uni-F* : GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAA
- 18S uni-R* : CCACCACCCATAGAATCAAGA
- 18S uni-P* : [Cy5]-ACGGAAGGGCACCACCAGGAGT-[BHQ-2]

* Cible des amorces 18S uni F, 18S uni R et de la sonde 18S uni P : ADNr 18S (loos *et al.*, 2009)

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.

Les fluorophores utilisés pour chaque sonde peuvent être modifiés, sous réserve que pour chaque sonde le fluorophore extincteur soit adapté au rapporteur associé, que d'une sonde à l'autre les fluorophores rapporteurs soient différents et que l'appareil de PCR en temps réel employé soit compatible.

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 (Promega Réf. : MC1411) - RNase A Solution (Promega Réf. A7973 1 mL ou A7974 5 mL)
- 2-propanol (isopropanol)
- Ethanol 70%vol
- Ethanol 50%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 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 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.

- Un contrôle de la qualité de l'extraction d'ADN et de la présence d'inhibiteur sera réalisé pour chaque prise d'essai. Il prendra la forme d'un test PCR temps réel utilisant la combinaison d'amorces / sonde 18S uni -F/-R/-P (IOOS *et al.* 2009). Ce test permet de générer un signal de fluorescence de nature exponentielle significativement supérieur au bruit de fond si de l'ADN de plante est présent dans un extrait, sans effet inhibiteur suffisant (IOOS *et al.* 2009). Toutefois, les prises d'essai qui sont positives pour le test ciblant *Xylella fastidiosa* ne nécessiteront pas systématiquement de contrôle de la qualité d'ADN

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).

Tableau 1 : Erreurs maximales tolérées

Grandeur	EMT
Volume	EMT définies par la MOA022 version en vigueur ou par la norme NF EN ISO 8655-2
Masse	EMT = $\pm 10\%$
Température	Thermobloc, bain à sec : EMT = $\pm 5^{\circ}\text{C}$ Réfrigérateur : 5°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

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 et/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 dispenseur
- 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

- Automate de type KingFisher™ mL (Thermo Fisher Scientific), ou KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processors (Thermo Fisher Scientific), compatible avec le kit QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile) et avec le kit Maxwell® HT Environmental TNA (Promega). **Il est à noter que le KingFisher™ mL n'est pas adapté au protocole utilisé avec le kit Maxwell® HT Environmental TNA qui comporte une étape d'élution à 70°C.**
- 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

Equipement pour l'amplification

- Pipettes automatiques (plage de mesure de 0,5 µL à 1 mL)
- Appareil de PCR en temps réel, jeu de filtres adaptés et logiciel associé

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 :

- 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. Le délai entre résultat positif de 1^{ère} intention et l'envoi pour confirmation au LNR doit aussi être le plus réduit possible.
- 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, copie du rapport du laboratoire agréé. Cette fiche est fixée à l'extérieur du colis.
- Dans le cas d'échantillons composites, le nombre de d'individus composant l'échantillon doit être indiqué sur la demande.

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 :

Tableau 2 : Conditions de conservation des échantillons

Étapes	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	≤-18°C	

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).

Cas d'échantillons individuels et des échantillons composites de petit volume (2 à 10 échantillons regroupés) :

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, pour les matrices autres que *Olea europaea* et *Quercus spp.* au minimum **1 g** de matériel végétal est prélevé. Pour les matrices *Olea europaea* et *Quercus spp.* au minimum **1,5 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).

Les valeurs chiffrées relatives au nombre de pétioles à prélever est donné à titre indicatif, le prélèvement pouvant être composé de différents tissus, comme par exemple un mélange de pétioles et de sections de tiges ou rameaux.

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.

Remarque importante : en cas d'échantillon composite (maximum 10 plantes regroupées), il est nécessaire de prélever **sur chaque** tige ou rameau composant l'échantillon.

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 :

Tableau 3 : Intervalles de pesée

Masse minimale	Masse cible	Masse maximale
0,95 g ≤	1,0 g	< 1,05 g
1,425 g ≤	1,5 g	< 1,575 g
4,75 g ≤	5,0 g	< 5,25 g

- 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 (extraction QuickPick™) ou de tampon CTAB (Extraction Promega) 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 : Les macérats préparés à partir de 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 (extraction QuickPick™) ou de tampon CTAB (extraction Promega) pour le contrôle négatif de processus.

Cas des échantillons composites de volume important (11 à 50 plantes regroupées) :

Il est à noter que ce protocole a fait l'objet d'un rapport de validation uniquement avec la matrice immortelle d'Italie (*Helichrysum italicum*).

Dans ce cas, une étape de concentration supplémentaire est nécessaire.

Ce protocole n'est pas adapté pour les matrices végétales présentant des concentrations élevées en inhibiteurs de la PCR (en particulier *Olea europaea*, *Quercus* spp.).

- Les échantillons sont préparés en prélevant, à titre d'exemple, 2 sections de tige de 2-3 cm par plante prélevées sur 2 rameaux différents en vue d'obtenir une masse de 5 g minimum pour un pool de 50 plantes.
- Ajouter 3 mL d'eau déminéralisée stérile par gramme d'échantillon.
- Ecraser grossièrement l'ensemble des 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.
- La totalité du volume de macérat est transféré dans un tube à centrifuger de volume adapté.
- Une première centrifugation est réalisée à 180 g environ pendant 10 min environ.
- Le surnageant est transféré dans un nouveau tube à centrifuger en prenant soin de ne pas toucher au culot.
- Une deuxième centrifugation de ce surnageant est réalisée à 10 000 g environ durant 20 min environ. Le surnageant est jeté cette fois et le culot est repris dans 2 mL d'eau déminéralisée stérile.
- Suivre ensuite le protocole QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile) développé au point 8.2.1.

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™ SML Plant DNA (Bio-Nobile) pour matrices autres qu'*Olea europaea* et *Quercus* spp.

Ce protocole nécessite un appareil de type 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 :

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

Reagent:	8 preps	24 preps	96 preps
Plant DNA Magnetic Particles ⁽¹⁾	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 ⁽²⁾	1 ml	4.25 ml	13.5 ml
Plant DNA Wash Buffer ⁽²⁾	6 ml 22 ml	2 x 40 ml	
Plant DNA Elution Buffer	1 ml	7 ml	22 ml

¹Reagents contain 0.02% NaN₃.

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.
- 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 est inséré dans chaque série lors de l'utilisation de l'automate.

Mode opératoire spécifique aux appareils 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 les éluats dans de nouveaux tubes. 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 2.

8.2.2 Protocole Maxwell® HT Environmental TNA (Promega) pour matrices *Olea europaea* et *Quercus* spp.

Ce protocole nécessite un appareil de type KingFisher™ Flex (Thermo Fisher Scientific) ainsi que les barrettes ou microplaques et capuchons plastiques décrits au point 5.6. L'automate doit permettre de réaliser l'étape d'élution à la température de 70°C.

Ce protocole nécessite les composants du kit Maxwell® HT Environmental TNA (Promega réf. AX9190) présentés dans le tableau 5 ci-après :

Tableau 5 : Composants du kit Maxwell® HT Environmental TNA (Promega)

Réactifs
CTAB Buffer (Promega Réf. MC1411)*
Protease Solution
RNase A Solution (Promega Réf. A7973 1 mL ou A7974 5 mL)**
Resin
Cell Lysis Buffer (CLD)
Wash Buffer (WBA)
25 mM Tris-HCl, pH 8.0

* Fourni dans le kit mais en quantité limitante

** Non fourni dans le kit

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 ;
- Transférer 2 x 1mL de macérat dans 2 microtubes 1,5 ou 2 mL ;
- Ajouter 60 µL de Protease Solution et 20 µL de RNase A Solution ;
- Vortexer ;
- Incuber environ 30 min 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 est inséré dans chaque série lors de l'utilisation de l'automate.

Préparation des plaques

Les volumes de réactifs sont déposés selon les indications du schéma 2 ci-après.

Avant dépôt, remettre les billes magnétiques en suspension par agitation manuelle et/ou pipetage jusqu'à ce qu'aucun amas/agrégat de billes ne soit plus visible (ne pas vortexer).

A chacune des différentes étapes : Lysis-Binding / lavage 1 / lavage 2 / lavage 3 / Elution, 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 Lysis-Binding / lavage 1 / lavage 2 / lavage 3, les plaques utilisées sont les « KingFisher 96 Deepwell plates ». Pour l'étape d'éluion, utiliser les « KingFisher 96 plates ».

	Plaque Deepwell 1 : Lysis / Binding			Plaque Deepwell 2 : Lavage 1		Plaque Deepwell 3 : Lavage 2		Plaque Deepwell 4 : Lavage 3	Plaque 5 : Elution
Tampon	Cell Lysis Buffer	Isopropanol	Resin	Wash Buffer	Ethanol 50%vol	Wash Buffer	Ethanol 50%vol	Ethanol 50%vol	25 mM Tris-HCl
Volume (µL)	300	380	20	900	100	400	50	450	110

Schéma 2 : plan de dépôt des solutions et tampons

Extraction et éluion de l'ADN

- Centrifuger les lysats environ 10 min à environ 20 000 g.
- Reprendre 300 µL de surnageant et le déposer dans la plaque Deepwell 1
- Allumer l'automate et démarrer le programme spécifique (durée environ 55 minutes). Le programme est décrit en annexe 4

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 duplex

Pour chaque solution 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 pour la cible *X. fastidiosa* 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 avec le kit Promega sur *Olea europaea* et *Quercus* spp.

Tableau 6 : Composition du mélange réactionnel pour amplification par PCR en temps réel Harper *et al.*, 2010 / loos *et al.*, 2009 de l'ADN extrait avec le kit Promega sur olivier (*Olea europaea*) et chênes (*Quercus* spp.)

Réactifs	Concentration finale ou volume final
Eau ultra pure	qsp 16 μ L
TaqMan™ Fast Universal Master Mix (2X), no AmpErase™ UNG (Applied Biosystems)	1 X
Amorce sens XF-F	0,3 μ M
Amorce antisens XF-R	0,3 μ M
Sonde XF-P	0,1 μ M
Amorce sens 18S uni-F	0,3 μ M
Amorce antisens 18S uni-R	0,3 μ M
Sonde 18S uni-P	0,1 μ M
BSA	0,3 μ g/ μ L
Mélange réactionnel	16 μ L
Extrait d'ADN	4 μL
Volume final	20 μ L

8.3.2 Conditions d'amplification B après extraction d'ADN avec le kit QuickPick™ sur matrices autres que *Olea europaea* et *Quercus* spp.

Tableau 7 : Composition du mélange réactionnel pour amplification par PCR en temps réel Harper *et al.*, 2010, erratum 2013/ loos *et al.*, 2009 de l'ADN extrait avec le kit QuickPick™ pour des matrices autres qu'olivier (*Olea europaea*) et chênes (*Quercus* spp.)

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
Amorce sens 18S uni-F	0,3 µM
Amorce antisens 18S uni-R	0,3 µM
Sonde 18S uni-P	0,1 µM
BSA non acétylée	0,3 µg/µL
Mélange réactionnel	18 µL
Extrait d'ADN	2 µL
Volume final	20 µL

Les différents paramètres de l'amplification par PCR en temps réel pour la détection de *X. fastidiosa* sont présentés dans le tableau 8 ci-après:

Tableau 8 : Paramètres d'amplification

Etape	Température	Durée programmée	Nombre de cycle
Pré-incubation	95°C	30 s	1
Dénaturation	94°C	10 s	40
Hybridation / Elongation (mesure de la fluorescence à la fin de chaque cycle)	62°C	40 s	

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 témoin positif d'amplification a généré une courbe de fluorescence de type exponentielle et une valeur de Ct ≤ à 38.
- Le contrôle interne a généré une courbe de fluorescence de type exponentiel et une valeur de Ct ≤ à 38.

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 interne a généré une courbe de fluorescence de type non exponentiel et/ou une valeur de Ct > à 30, l'amplification devra être réitérée pour les échantillons concernés sur les extraits d'ADN dilués au 10^{ème} 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 les tableaux 9 et 10 ci-après :

Tableau 9 : Règle de cut-off applicables pour la cible *X. fastidiosa*

Valeur de Ct obtenue pour le réplicat	Statut du réplicat
Ct ≤ 38	Positif
Ct > 38	Négatif

Tableau 10 : Règle de cut-off applicable pour la cible 18S (contrôle interne)

Valeur de Ct obtenue pour le réplicat	Statut du réplicat
Ct ≤ 30	Positif
Ct > 30	Négatif

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 les tableaux 11 et 12 ci-après :

 Tableau 11 : Interprétation des résultats du test *X. fastidiosa*

Type résultat	Résultat cible Xf sur prise d'essai A	Résultat cible Xf sur prise d'essai B	Action	Interprétation / marche à suivre / Expression des résultats
1	+/+	+/+	Fin	<i>X.fastidiosa</i> détecté
2	+/+	+/-	Fin	<i>X.fastidiosa</i> détecté
3	+/+	-/-	Fin	<i>X.fastidiosa</i> détecté
4	+/-	+/-	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: Interpréter le test 18S uni (tableau 12) Suite à la nouvelle extraction : si résultat 1, 2, 3 ou 4 : <i>X.fastidiosa</i> détecté ; si résultat 5 ou 6 : Interpréter le test 18S (tableau 12)
5	+/-	-/-	PCR à refaire	
6	-/-	-/-	Interpréter le test 18S uni	Cf. tableau 12 test 18S uni

Tableau 12 : Interprétation des résultats du test 18S uni dans les cas 4, 5 et 6 du tableau 11

Type résultat	Résultat cible 18S uni sur prise d'essai A	Résultat cible 18S uni sur prise d'essai B	Conformité du contrôle interne	Action	Interprétation / marche à suivre / Expression des résultats
1	+/+	+/+	Conforme	Fin	<i>X. fastidiosa</i> non détecté
2	+/+	+/-	Conforme	Fin	<i>X. fastidiosa</i> non détecté
3	+/+	-/-	Non conforme	PCR à refaire sur ADN dilué au 10 ^{ème} et non dilué	Suite à la nouvelle PCR : si résultat 1, 2, 3 ou 4 : <i>X.fastidiosa</i> non détecté ; Si résultat 5 ou 6: extraction à renouveler (2 prises d'essais par échantillon). Suite à la nouvelle extraction : si résultat 1, 2, 3 ou 4 : <i>X.fastidiosa</i> non détecté ; Si 5 ou 6 à nouveau obtenu pour 18S uni, Fin : Résultat indéterminé (préciser la cause sur le dossier analytique et sur le rapport : présence d'effet inhibiteur de PCR)
4	+/-	+/-	Non conforme		
5	+/-	-/-	Non conforme		
6	-/-	-/-	Non conforme		

Ce tableau décisionnel est également valable en cas d'introduction de dilution au 1/10^{ème} 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/Indéterminé », « détecté/non détecté/Indéterminé » 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 les tableaux ci-après est extraite du rapport de validation de la MA039 version 6 « Détection de *Xylella fastidiosa* par PCR en temps réel duplex sur végétal » établi par le LNR en novembre 2022.

Résultats sur souches pures

Tableau 13 : Valeurs des critères de performance sur souches pures et extraits d'ADN

Critères de performance	Valeur obtenue	Principales informations relatives aux modalités de réalisation de la caractérisation
Inclusivité	100%	15 souches de <i>X. fastidiosa</i> appartenant aux sous-espèces <i>fastidiosa</i> , <i>sandyi</i> , <i>morus</i> , <i>multiplex</i> et <i>pauca</i>
Exclusivité	100%	43 souches bactériennes non cibles (41 souches pures et 2 extraits d'ADN (Phytoplasmes))

Résultats sur matrices autres que *Olea europaea* et *Quercus* spp. (validation intra-laboratoire)

Extraction d'ADN avec kit QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile)

Les modifications apportées dans cette nouvelle version de la méthode concernent le programme PCR et l'ajout d'un contrôle interne. Ces modifications ont été évaluées pour les matrices autres que *Olea europaea* et *Quercus* spp. sur échantillons naturellement contaminés de charges bactériennes diverses, issus du plan de surveillance national. Cette évaluation a permis de constater l'absence d'interférence de ces modifications sur les performances de la méthode. Le tableau 14 ci-après présente les valeurs des caractéristiques de performance de la MA039v1.

Tableau 14 : Valeurs des critères de performance sur matrices artificiellement contaminées autres que *Olea europaea* et *Quercus* spp. (validation intra-laboratoire) **MA039v1**

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 ² bact./mL
	Vigne (<i>Vitis vinifera</i>)	1.10 ³ 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 15 : Valeurs des critères de performance sur matrices autres que *Olea europaea* et *Quercus* spp. sur 27 échantillons pour confirmation du plan de surveillance 2021 / 2022 (validation intra-laboratoire) **MA039v6**

Caractéristique de performance	Paramètre de la caractérisation	Valeur obtenue à l'issue de la caractérisation
Sensibilité relative	27 échantillons pour confirmation du plan de surveillance 2021 / 2022 autres que <i>Olea europaea</i> et <i>Quercus</i> spp.	109%
Robustesse de la PCR en temps réel	PCR en temps réel 2 µL d'ADN	Absence de résultat faux positif et faux négatif

Résultats sur matrices *Olea europaea* et *Quercus ilex* (validation intra-laboratoire)

Extraction avec le kit Maxwell® HT Environmental TNA (Promega)

Tableau 16 : Valeurs des critères de performance sur matrices artificiellement contaminées *Olea europaea* et *Quercus ilex* (validation intra-laboratoire) **MA039v6**

Caractéristique de performance	Paramètre de la caractérisation	Valeur obtenue à l'issue de la caractérisation
Seuil de détection (avec un taux de détection de 100%)	<i>Olea europaea</i>	1.10 ⁴ bact./mL
	<i>Quercus ilex</i>	1.10 ³ bact./mL
Sensibilité relative par rapport à la méthode de référence (extraction CTAB)	<i>Olea europaea</i>	153%
	<i>Quercus ilex</i>	111%
Sélectivité (sur échantillons dont la concentration en cible est supérieur ou égale au seuil de détection)		100%
Spécificité	<i>Olea europaea</i> et <i>Quercus ilex</i>	100%
Exactitude au seuil de détection		100%
Répétabilité		100%
Reproductibilité au seuil de détection		<i>Olea europaea</i>
	<i>Quercus ilex</i>	100%
Robustesse de la PCR en temps réel	Variation de ± 2°C de la température d'hybridation de la PCR en temps réel	Absence de résultat faux positif et faux négatif

Résultats sur matrices *Helichrysum italicum* pour les échantillons composites de volume important (11 à 50 plantes regroupées) (validation intra-laboratoire)

Extraction d'ADN avec kit QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile)

 Tableau 17 : Valeurs des critères de performance sur matrice *Helichrysum italicum* artificiellement et naturellement* contaminées (validation intra-laboratoire) **MA039v5**

Caractéristique de performance	Paramètre de la caractérisation		Valeur obtenue à l'issue de la caractérisation
Sensibilité diagnostique	Echantillons de confirmation*		100%
Sensibilité relative	Pool de 50	10 ³ bac/mL	3,70%
		10 ⁴ bac/mL	100%
		10 ⁵ bac/mL	100%
Spécificité	Sur matrices végétales non dopées		100%
Exactitude	Pool de 50	10 ³ bac/mL	13%
		10 ⁴ bac/mL	100%
		10 ⁵ bac/mL	100%
Reproductibilité	Pool de 50	10 ³ bac/mL	92,60%
		10 ⁴ bac/mL	100%
		10 ⁵ bac/mL	100%
Répétabilité	Pool de 50	10 ³ bac/mL	93,40%
		10 ⁴ bac/mL	100%
		10 ⁵ bac/mL	100%
Seuil de détection	Pool de 50	10 ⁴ bac/mL	100%

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.

Anses, LSV UBVO, Rapport de caractérisation et de validation d'une méthode d'analyse, Détection de *Xylella fastidiosa* par PCR en temps réel sur pools d'*Helichrysum italicum* version 01, Décembre 2020.

EFSA (European Food Safety Authority), Scientific report, Update of the *Xylella* spp. host plant database – systematic literature search up to 31 December 2021, *EFSA Journal*, 2022; 20(6):7356.

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.

Ioos R., Fourrier C., Iancu G., and Gordon T. R., Sensitive detection of *Fusarium circinatum* in pine seed by combining an enrichment procedure with a real-time polymerase chain reaction using dual-labeled probe chemistry, *Phytopathology*, 2009, 99, 582-590.

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

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.

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
Wash1		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
Wash2		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
Wash3		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
Elution		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.

PROJET

Annexe 3 : Programme d'extraction pour l'automate KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processors (Thermo Fisher Scientific) automate pour le kit Maxwell® HT Environmental TNA (Promega)

Reagent info

Wash 1		96 DW plate		
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type	
Wash Buffer	900	-	Reagent	
50% Ethanol	100	-	Reagent	

Wash 2		96 DW plate		
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type	
Wash Buffer	400	-	Reagent	
50% Ethanol	50	-	Reagent	








Lysis and Bind		96 DW plate		
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type	
Macerated sample	300	-	Sample	
Lysis Buffer	300	-	Reagent	
Isopropanol 100%	380	-	Reagent	
Resin	20	-	Reagent	




Ethanol Wash		96 DW plate		
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type	
50% Ethanol	450	-	Reagent	

Elution		96 DW plate		
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type	
25mM Tris-HCl	110	-	Reagent	

Tip Plate		96 DW plate		
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type	
Empty	1	-	Reagent	

Steps data

	Tip1	96 DW tip comb	
	Pick-Up	Tip Plate	
	Bind	Lysis and Bind	
	Beginning of step	Precollect	No
		Release time, speed	00:00:30, Fast
	Mixing / heating:	Mixing time, speed	00:15:00, Half mix
		Heating during mixing	No
	End of step	Postmix time	00:05:00, Medium
		Collect count	5
		Collect time [s]	15
	Wash 1	Wash 1	
	Beginning of step	Precollect	No
		Release time, speed	00:00:30, Bottom mix
	Mixing / heating:	Shake 1 time, speed	00:01:00, Bottom mix
		Shake 2 time, speed	00:01:00, Half mix
		Heating during mixing	No
	End of step	Postmix	No
		Collect count	3
		Collect time [s]	5
	Wash 2	Wash 2	
	Beginning of step	Precollect	No
		Release time, speed	00:00:30, Bottom mix
	Mixing / heating:	Shake 1 time, speed	00:01:00, Bottom mix
		Shake 2 time, speed	00:01:00, Fast
		Heating during mixing	No
	End of step	Postmix	No
		Collect count	3
		Collect time [s]	5
	Wash 3	Ethanol Wash	
	Beginning of step	Precollect	No
		Release time, speed	00:00:30, Fast
	Mixing / heating:	Shake 1 time, speed	00:01:00, Bottom mix
		Shake 2 time, speed	00:01:00, Half mix
		Heating during mixing	No
	End of step	Postmix	No
		Collect count	3
		Collect time [s]	5
	Dry1	Ethanol Wash	
		Dry time	00:07:00
		Tip position	Outside well / tube

	Elution	Elution		
	Beginning of step	Precollect	No	
	Mixing / heating:	Release time, speed	00:00:30, Bottom mix	
		Mixing time, speed	00:05:00, Bottom mix	
		Heating temperature [°C]	70	
	End of step	Preheat	Yes	
		Postmix time	00:02:00, Bottom mix	
Collect count		5		
	Collect time [s]	30		
	ReleaseBeads1	Wash 1		
		Release time, speed	00:00:30, Bottom mix	
	Leave	Ethanol Wash		

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.