



Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/ LSV / MA 039 version 1

Octobre 2015

Détection de *Xylella fastidiosa* par PCR en temps réel sur plantes hôtes

Laboratoire de la santé des végétaux

Laboratoire national de référence Bactéries phytopathogènes sur
matrices autres que bananier, agrumes et plantes tropicales

Le présent document est, sous sa forme électronique, mis à la disposition des utilisateurs en tant que méthode d'analyse. Ce document est la propriété de l'Anses. Toute reproduction, qu'elle soit totale ou partielle, n'est autorisée qu'à la condition expresse que la source soit citée, par exemple en faisant mention de sa référence (incluant sa version et année) et de son titre.



Historique de la méthode

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

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

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

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

Version	Nature des modifications	Date	Principales modifications
v1	Sans objet	15/10/2015	Version initiale



Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

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

Laboratoire National de Référence : Bactéries phytopathogènes sur matrices autres que bananier, agrumes et plantes tropicales

Adresse : 7 rue Jean Dixméras

49044 Angers CEDEX01

Contact : angers.lsv@anses.fr



Sommaire

Avant-propos	3
Introduction.....	5
Avertissements et précautions de sécurité	6
1 Objet et domaine d'application	7
2 Documents de référence.....	7
3 Termes, sigles et définitions	7
4 Principe de la méthode	8
5 Réactifs et consommables	9
5.1 Eau	9
5.2 Kit d'extraction d'ADN	9
5.3 Oligonucléotides	9
5.4 Kit de PCR en temps réel.....	10
5.5 Autres réactifs	10
5.6 Autres consommables à usage unique.....	10
5.7 Contrôles et témoins.....	11
6 Appareillage et matériels	12
7 Échantillons	13
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	13
7.2 Conservation des échantillons avant analyse.....	13
7.3 Conservation des reliquats de matériels utilisés.....	13
8 Mode opératoire.....	14
8.1 Prélèvement, broyage et macération des tissus végétaux	14
8.2 Extraction de l'ADN	15
8.2.1 Préambule	15
8.2.2 Mise en œuvre préalable.....	15
8.2.3 Lyse cellulaire.....	16
8.2.4 Extraction automatisée d'ADN	16
8.2.5 Extraction manuelle d'ADN	17
8.3 Test de PCR en temps réel	18
9 Résultats.....	19
9.1 Contrôle qualité	19
9.2 Calculs et expression des résultats	19
10 Caractéristiques de performance de la méthode.....	21
Annexe 1 : programme d'extraction pour l'automate BioSprint15 (Qiagen) automate pour le kit QuickPick™	24
Annexe 2 : programme d'extraction pour l'automate KingFisher™ mL (Thermo Scientific) automate pour le kit QuickPick™	27
Annexe 3 : programme d'extraction pour l'automate KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processors (Thermo) (Thermo Scientific) automate pour le kit QuickPick™	29
Bibliographie.....	31



Introduction

Xylella fastidiosa (Wells *et al.* 1987) est une bactérie listée dans l'annexe 1, partie A, chapitre 1 de la directive 2000/29/CE. C'est à ce titre un organisme réglementé dans l'Union Européenne. 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* 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*.

De nombreuses espèces végétales contaminées par la bactérie peuvent rester asymptomatiques et présenter de faibles 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.

Xylella fastidiosa est une bactérie du xylème présente sur le continent américain sur une large gamme d'hôtes. Il a été décrit à ce jour six sous-espèces de la bactérie, chacune plus ou moins inféodée à une gamme de plantes hôtes et 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 maintenant un organisme émergent en Europe avec la déclaration fin 2013 d'un foyer sur olivier en Italie (Saponari *et al.*, 2013). 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 de plants de caféiers (*Coffea arabica* et *C. canephora*) originaires d'Amérique latine. En juillet 2015, la bactérie a été découverte sur le territoire corse, notamment sur polygale (*Polygala myrtifolia*).

Les principaux symptômes provoqués par *Xylella fastidiosa* sont des brûlures foliaires, suivi dans certains cas d'un dessèchement généralisé de la plante et des 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>).

La présente méthode basée sur une détection par PCR en temps réel décrit deux protocoles d'extraction de l'ADN, de performances proches, l'un basé sur l'utilisation d'un automate permettant un gain de temps opérateur, l'autre réalisé manuellement. Une extraction automatisée est préférable pour traiter les séries d'échantillons importantes.

Les laboratoires utilisateurs de cette méthode se référeront aux conditions de mises en œuvre des techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques décrites dans la MOA022 (version en vigueur).



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 de définir et d'appliquer des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité, et de s'assurer de leur conformité à la réglementation nationale en vigueur.

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

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

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 la directive européenne 2008/61 CE. Il est nécessaire que les installations de laboratoire permettent le contrôle des déchets solides, liquides et des insectes vecteurs afin de manipuler les échantillons 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 infecté (ou de statut indéterminé/suspicion) et isolat bactérien en résultant doivent être détruits par autoclavage ou autre moyen inactivant les bactéries, ainsi que tous les consommables avec lesquels ils ont été en contact.

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



1 Objet et domaine d'application

La présente méthode a pour objet la détection de la bactérie phytopathogène *X. fastidiosa*.

Une analyse basée sur la technique de PCR en temps réel utilisant une sonde d'hydrolyse et un couple d'amorces dont la combinaison est spécifique de *X. fastidiosa* est proposée dans cette méthode.

La méthode s'applique à toute plante hôte de *X. fastidiosa* (liste EFSA, 2015), qu'elle soit symptomatique ou non. Elle s'applique sur pétioles et nervures centrales. Pour certaines plantes hôtes, comme par exemple le romarin (*Rosmarinus officinalis*), les pétioles sont quasiment absents et la très petite taille des feuilles ne permet pas le prélèvement de la nervure centrale. Dans ce cas, les feuilles entières sont prélevées pour l'analyse.

Cette méthode est qualitative. Elle permet de détecter la présence de *Xylella 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 contaminé 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*. La méthode présentée a été validée en vue d'analyses officielles réalisées dans le cadre des contrôles phytosanitaires en surveillance du territoire, à l'importation, à l'exportation de végétaux ou en gestion de foyers.

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

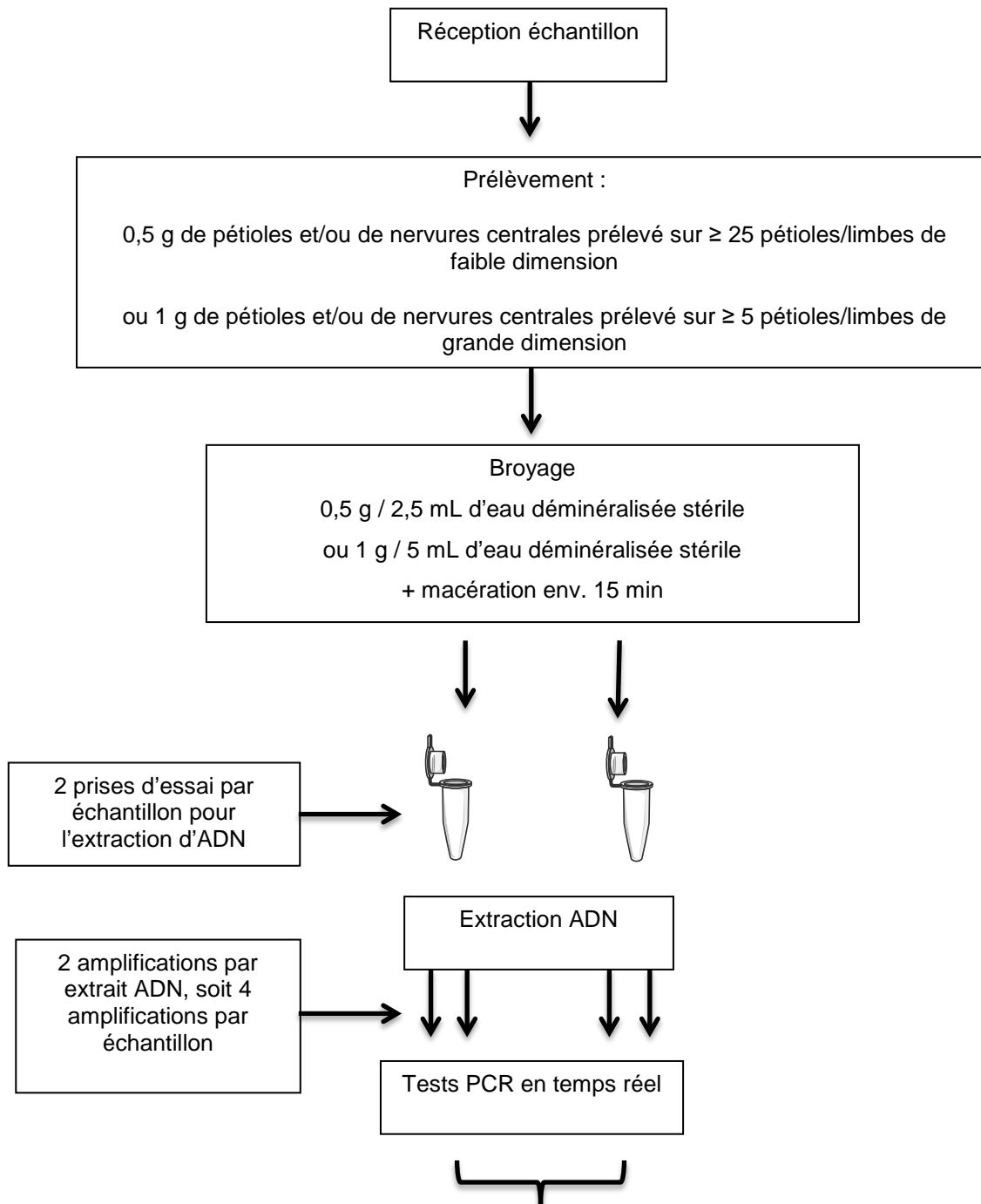
Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans les méthodes officielles du ministère chargé de l'agriculture est issu des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP...).

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 :



***Xylella fastidiosa* détectée, non détectée, ou statut de l'échantillon indéterminé**



5 Réactifs et consommables

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces produits.

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 ou ARN), de nucléase, d'inhibiteur ou de tout autre élément pouvant interférer avec les réactifs du test.

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 analysés 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) (Rapport de caractérisation et de validation de la méthode MA039 version 01).

5.3 Oligonucléotides

Amorce ou sonde	Séquence
XF-F*	5'-CACGGCTGGTAACGGAAGA-3'
XF-R*	5'-GGGTTGCGTGGTCAAATCAAG-3'
XF-P*	5-'6-FAM-TCGCATCCCGTGGCTCAGTCC-BHQ-1-3'

* 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 qualité.

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, Applied Biosystems (40352042) (Rapport de caractérisation et de validation de la méthode MA039 version 1).

5.5 Autres réactifs

- BSA (qualité biologie moléculaire - attention: ne pas utiliser de BSA acétylée)

Et produits courants d'un laboratoire de microbiologie et biologie moléculaire tels que :

- Désinfectant à action bactéricide
- Ethanol 70 % (v/v)
- Ethanol 96–100 % (v/v)
- Solution d'hypochlorite de sodium utilisée à une concentration d'environ 1,3 % de chlore actif (ou autres produits de nettoyage équivalents permettant la destruction des traces d'ADN)

5.6 Autres consommables à usage unique

- Cônes à filtre pour pipettes de volumes adaptés (plage 0,5 µL à 5 mL) (biologie moléculaire)
- Cônes pour pipettes de volumes adaptés (plage 1 mL à 5 mL) (préparation échantillon - macérats)
- Microtubes de 2 mL
- Microtubes ou capillaires pour rtPCR de volume adapté au thermocycleur temps réel utilisé, à paroi fine, en barrette de 4 ou 8 puits ou en plaque de 96 puits.
- Coupelles de pesée ou autre système de pesée adapté
- Microplaques 96 puits (qualité PCR en temps réel)
- Microtubes 1,5 mL et/ou 2 mL
- Sacs plastiques de broyage avec gaze (par exemple sacs Bioreba)

Consommables spécifiques à l'utilisation des automates

- Barrettes de tubes 5-Tube strip (1mL) et peignes 5-Rod Cover (Qiagen) pour le BioSprint 15
- ou barrettes de tubes KingFisher™ mL tube strip 5 et peignes KingFisher™ mL Tip comb 5 (Thermo Scientific) pour le KingFisher™ mL



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 :

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

Les contrôles à produire 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 contaminée avec une suspension bactérienne. Il permet de contrôler la qualité de la manipulation ainsi que le bon fonctionnement du matériel. Si une série d'analyse comporte des échantillons d'espèces végétales différentes, **réaliser si possible un témoin positif de processus par espèce végétale, ou au moins un par genre botanique.**
Le contrôle positif de processus est composé d'un volume de 250 µL de macérat d'une matrice donnée auxquels sont ajoutés 5 µL de suspension bactérienne d'une souche de *X. fastidiosa* de référence. La suspension bactérienne doit présenter une concentration d'environ 10^7 bactéries/ mL de manière à obtenir une concentration finale de l'ordre de 10^5 bactéries / mL.
- Un contrôle négatif de processus : il sera préparé pour chaque série d'extractions. Une prise d'échantillon "eau", subira donc toutes les phases de l'analyse 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 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" 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.

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



6 Appareillage et matériels

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie 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.

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 ; EMT conformes à la norme ISO 8655-2)
- Presse pneumatique (ou équivalent pour le broyage)
- Petits équipements de laboratoire : ciseaux, pinces, scalpel, sécateur

Extraction des ADN

Méthode automatisée

- **Automate de type BioSprint 15 (Qiagen) ou KingFisher™ mL (Thermo Scientific) compatible avec le QuickPick™ SML Plant DNA Kit (Bio-Nobile)**

Remarque : l'automate KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processors (Thermo Scientific) a fait l'objet d'une comparaison de résultats avec le KingFisher™ mL (Thermo Scientific) par le LNR. Les résultats ont permis de conclure à la possibilité d'utiliser cet automate pour la mise en œuvre de la présente méthode.

Les consommables spécifiques de cet automate sont : KingFisher Flex 96 tip comb for PCR magnets et, KingFisher Flex Microtiter Deepwell 96 plate, V-bottom et KingFisher 96 plate 200 µL, V-bottom (Thermo Scientific) pour le KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processors

Méthode manuelle

- **Barrette d'aimants de type DynaMag-2™ (Invitrogen) compatible avec le QuickPick™ SML Plant DNA Kit (Bio-Nobile)**
- Agitateur à oscillation (= agitateur basculant) (pour le protocole manuel)

Equipements communs aux deux méthodes

- 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 plastique de 1,5 et 2 mL
- Centrifugeuse de paillasse type « microspin »
- Pipettes automatiques (plage de mesure de 0,5 µL à 5 mL ; EMT conformes à la norme ISO 8655-2)
- Thermobloc ou bain-à-sec avec agitation (température = 65°C ±3°C) (pour la lyse cellulaire) ou enceinte thermostatée (température 65°C ±3°C) + système d'agitation



Équipement pour l'amplification

- Pipettes automatiques (plage de mesure de 0,5 µL à 1 mL ; EMT conformes à la norme ISO 8655-2)
- Appareil de PCR en temps réel et ordinateur de pilotage capables de mesurer la fluorescence des reporteurs de type « FAM » ou des fluorophores de spectre équivalent. Les performances du

thermocycleur devront être démontrées expérimentalement (qualification biologique) ou par vérification métrologique (méthode validée avec l'appareil 7500 Fast Applied Biosystems)

Stockage des échantillons et des ADN

- Congélateur (température $\leq -18^{\circ}\text{C}$)
- Réfrigérateur (température = $5^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$)

7 Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Les échantillons reçus pour analyse doivent être dans un bon état de conservation, c'est-à-dire, ni desséchés, ni en cours de décomposition. Dans le cas contraire, le laboratoire émet des réserves sur tout résultat d'analyse négatif en précisant la raison. Si les échantillons arrivent dans un état trop dégradé, le laboratoire peut refuser l'analyse. Le refus d'analyse doit être motivé (par exemple : échantillon dégradé, quantité insuffisante,...) et doit être notifié au client dans les plus brefs délais. Le délai d'acheminement des échantillons doit donc être compatible avec le besoin du laboratoire. Sur demande, le laboratoire peut fournir des indications sur la constitution du colis à expédier.

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 (+/- 4°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 des étapes indiquées dans le mode opératoire.

7.3 Conservation des reliquats de matériels utilisés

Les laboratoires doivent conserver les reliquats pertinents (nature, quantité et qualité) de matériel soumis à analyse, dans des conditions appropriées garantissant leur intégrité (cf. tableau ci-après), jusqu'à au moins le quinzième jour calendaire suivant l'envoi au demandeur du rapport d'analyse. Dans le cas d'un résultat positif ou indéterminé, ce délai est prolongé à 12 mois pour les reliquats qui le permettent selon les modalités détaillées dans le tableau ci-après.

Ce délai imposé est destiné à laisser le temps au demandeur de l'analyse de contester le résultat auprès du laboratoire (ce qui prolonge la conservation du reliquat jusqu'à l'issue de la contestation) et éventuellement de demander une analyse contradictoire ou une analyse de confirmation.



Tableau 1 : Type de reliquats d'échantillons à conserver et conditions de leur conservation pour les besoins d'analyses contradictoires et /ou de confirmation.

Etapes	Type de reliquat	Conservation		Modalités d'envoi à un autre laboratoire le cas échéant
		Conditions	Durée	
Prise d'essai	Feuilles/rameaux	+5°C	Tout résultat : 15 jours après envoi du rapport	Sachets individuels fermés et clairement identifiés Température ambiante Transporteur express avec suivi
		≤-18°C	Résultat autre que négatif: 12 mois	
Macération/ Broyage	Macérat/ Broyat végétal	≤-18°C	Tout résultat : 15 jours après envoi du rapport	Tubes / pots hermétiques clairement identifiés Température ambiante Transporteur express avec suivi
			Résultat autre que négatif: 12 mois	
Extraction d'ADN	Extraits d'ADN	≤-18°C	Résultat négatif : 15 jours après envoi du rapport	Tubes hermétiques clairement identifiés Température ambiante Transporteur express avec suivi
			Résultat autre que négatif: 12 mois	

8 Mode opératoire

8.1 Prélèvement, broyage et macération des tissus végétaux

- Pour les espèces végétales à **pétioles (ou nervures centrales) de grande dimension** (ex : caféiers, mûrier, vigne,...), l'analyse est réalisée sur **1 g** de matériel végétal (pétioles et/ou nervures centrales) prélevé sur au minimum 5 pétioles (ou nervures centrales) à partir de l'échantillon pour analyse.
- Pour les espèces végétales à **pétioles (ou nervures centrales) de petite dimension** (ex : polygales, olivier,...), l'analyse est réalisée sur **0,5 g** de matériel végétal (pétioles et/ou nervures centrales) prélevé sur au minimum 25 pétioles (ou nervures centrales) à partir de l'échantillon pour analyse.
- Pour les espèces végétales à feuilles **sans pétiole et à petite nervure centrale** (ex : romarin,...), l'analyse est réalisée sur **0,5 g** de matériel végétal constitué d'au moins 25 **feuilles entières** prélevé à partir de l'échantillon pour analyse.

Remarque : pour certaines espèces végétales (par exemple *Juniperus* sp., *Lagerstroemia* sp., *Myrtus communis*, espèces appartenant à la famille des *Malvaceae*,...), pour lesquelles les macérats présentent un aspect plus ou moins gélatineux, la prise d'essai doit être de 1 g au minimum.

Pour la pesée des échantillons, les intervalles de pesée présentés ci-après doivent être appliqués :

Masse minimale	Masse cible	Masse maximale
0,475 g ≤	0,5 g	< 0,525 g
0,95 g ≤	1,0 g	< 1,05 g

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



En deçà des quantités de matériel végétal spécifiées ci-avant, une réserve est émise sur tout résultat d'analyse négatif en précisant que la quantité de matériel végétal est inférieure à celle requise par la présente méthode.

- 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 % (v/v) ou d'eau.
- Découper les pétioles et/ou les nervures centrales en tronçons d'un centimètre environ.
- Dans la mesure du possible, sur espèces avec gros pétioles, il est recommandé de rafraîchir la base du pétiole afin d'éliminer la partie desséchée / oxydée avant de réaliser le prélèvement pour analyse.
- Réaliser la pesée de la prise d'essai (1 g ou 0,5 g 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).
- 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 congélateur (température $\leq -18^{\circ}\text{C}$).**
- Ajouter 5 mL d'eau déminéralisée stérile par gramme d'échantillon.
- Ecraser les tissus à l'aide d'un broyeur pneumatique (ou de tout autre équipement adapté).
- Laisser macérer sous agitation environ 15 minutes à température ambiante.
- Les macérats obtenus doivent être conservés à 5°C (+/- 4°C) et analysés dans la journée.
- **Dans le cas contraire, il est possible d'arrêter momentanément l'analyse à ce stade en conservant les macérats au congélateur (température $\leq -18^{\circ}\text{C}$).**
- Préparer un sac avec de l'eau pour le contrôle négatif de processus.

8.2 Extraction de l'ADN

8.2.1 Préambule

Ce protocole nécessite les composants du kit QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile).

L'extraction peut être réalisée, soit avec l'utilisation de l'automate (paragraphe 8.2.4. ci-après), soit manuellement avec l'utilisation d'un portoir aimanté (paragraphe 8.2.5. ci-après). Une première phase commune aux deux options est présentée dans les paragraphes 8.2.2/8.2.3. ci-après.

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

8.2.2 Mise en œuvre préalable

Mettre en chauffe le thermobloc ou le bain-à-sec à 65°C .

Si nécessaire, dissoudre les précipités présents dans les solutions tampons du kit en les chauffant dans un bain-marie (température $< 50^{\circ}\text{C}$).

Remettre les billes magnétiques en suspension par agitation manuelle et/ou pipetage (ne pas vortexer).



8.2.3 Lyse cellulaire

- Prélever 2 fois 250 μ L de macérat (tel que préparé au point 8.1) et les déposer dans 2 tubes de 1,5 mL ou 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.
- Reprendre le culot avec 75 μ L de tampon de lyse et 5 μ L de Protéinase K. Vortexer.
- 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).
- Continuer le protocole en suivant les paragraphes 8.2.4 ou 8.2.5. ci-après.

8.2.4 Extraction automatisée d'ADN

Cette partie du protocole nécessite l'appareil BioSprint15 (Qiagen) ou KingFisher mL (Thermo) ainsi que les barrettes 5-Tube strip (1mL) et les peignes 5-Rod Cover (Qiagen) ou les barrettes et capuchons équivalents (Thermo).

Un témoin d'extraction négatif et un témoin d'extraction positif, doivent être insérés dans chaque série, lors de l'utilisation de l'automate.

Préparation des barrettes

- Disposer les barrettes 5-Tube strip (1mL) sur le plateau de l'automate.
- Disposer les peignes (5-Rod Cover) sur les aimants dans l'automate, en veillant au sens et à l'alignement.

Déposer les solutions tampons dans les puits, selon le schéma suivant (barrette 5-Tube strip (1mL)) :

Côté gauche = languette	A		B	C	D	E
Tampon	Capture "Binding"	Billes magnétiques	Lavage	Lavage	Lavage	Elution
Volume (μ L)	125	5	250	250	250	50



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 annexes 1, 2 ou 3 selon l'automate utilisé.

Transfert final de l'ADN

- Sortir le plateau et transférer si besoin l'ADN dans un nouveau tube. La solution d'ADN est alors prête à l'emploi. Il est possible de stocker la solution d'ADN plusieurs jours au réfrigérateur (5°C ± 4°C) avant analyse, ou au congélateur (≤ - 18°C) pour une conservation à plus long terme.

8.2.5 Extraction manuelle d'ADN

Cette partie du protocole nécessite la barrette aimantée DynaMag™-2 (Invitrogen) (ou autres types d'aimants adaptés).

Capture de l'ADN (binding)

- Centrifuger les lysats (obtenus en fin de partie 8.2.3) environ 5 min à environ 18 000 g à température ambiante.
- Reprendre le surnageant et le transférer dans un nouveau tube de 2 mL contenant 125 µL de tampon de capture (« binding ») et 5 µL de suspension de billes magnétiques.
- Incuber à température ambiante pendant environ 10 minutes avec agitation douce en continue (utilisation possible d'un agitateur basculant).
- Centrifuger environ 5 s à environ 250 g.
- Déposer les tubes sur la barrette aimantée et laisser les billes former un culot le long du tube, durant 5 minutes au minimum.
- Evacuer tout le surnageant en veillant à ne pas pipeter de billes magnétiques.

Lavage

- Retirer les tubes de la barrette aimantée.
- Ajouter 250 µL de tampon de lavage.
- Agiter manuellement pendant environ 1 min.
- Déposer les tubes sur la barrette aimantée et laisser les billes former un culot le long du tube, durant 5 minutes au minimum.
- Evacuer tout le surnageant en veillant à ne pas pipeter de billes magnétiques.
- Répéter deux fois les étapes de lavage décrites ci-avant.

Elution de l'ADN

- Retirer les tubes de la barrette aimantée.
- Ajouter 50 µL de tampon d'élution.
- Mettre en agitation douce en continue pendant environ 10 minutes (utilisation possible d'un agitateur basculant).
- Centrifuger environ 5 s à environ 250 g.
- Déposer les tubes sur la barrette aimantée et laisser les billes former un culot le long du tube, durant 5 minutes au minimum.
- Transférer le surnageant dans un nouveau tube. La solution d'ADN est prête à l'emploi.
- Il est possible de stocker la solution d'ADN plusieurs jours au réfrigérateur (5°C ± 4°C) avant analyse, ou au congélateur (≤ - 18°C) pour une conservation à plus long terme.



8.3 Test de 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 de PCR composé de l'eau ultra pure utilisée pour la réalisation du mélange réactionnel
- un témoin positif de PCR composé d'une solution d'ADN cible.

La composition du mélange réactionnel pour une réaction est la suivante:

Réactifs	Concentration finale	A titre indicatif	
		Concentration initiale	Volume /microtube (en µL)
Eau ultra pure			6,48
Master Mix Fast (AB)	1 X	2 X	10,00
XF-F*	0,30 µM	10 µM	0,60
XF-R	0,30 µM	10 µM	0,60
XF-P*	0,10 µM	10 µM	0,20
BSA	0,30 µg/µL	50 µg/µL	0,12
Mélange réactionnel			18
Extrait d'ADN			2
Volume final			20

*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)

Programme du thermocycleur :

En mode normal		Température	Durée
Activation		50°C	2 min
		95°C	10 min
40 cycles :	Dénaturation	94°C	10 s
	Hybridation / Elongation	62°C	40 s
			Lecture à chaque fin de cycle



9 Résultats

9.1 Contrôle qualité

Si les résultats obtenus pour les contrôles mis en œuvre ne sont pas ceux attendus, la manipulation (série d'analyses) est déclarée non conforme et devra être renouvelée.

9.2 Calculs et expression des résultats

Si la série d'analyse est validée, les résultats peuvent être considérés comme interprétables pour l'ensemble des prises d'essai et de leurs réplicats, testés au cours de la même réaction de PCR.

Un résultat est considéré positif si la courbe des valeurs de fluorescence présente une allure caractéristique (courbe en S – tracé de la fonction sigmoïde) et si la valeur de Ct est inférieure à 40. Les courbes pour lesquelles les valeurs de Ct (cycle threshold) sont comprises dans l'intervalle > 35 et ≤ 40 ne présentent généralement pas ce tracé caractéristique. Dans ce cas, le résultat est interprété comme étant indéterminé.

Pour la détermination de la ligne de seuil (threshold), il est possible d'utiliser la détermination automatique réalisée avec le logiciel du thermocycleur ou de positionner la ligne de seuil manuellement, une valeur de Log au-dessus de la valeur de bruit de fond la plus élevée. Selon le type de thermocycleur et de logiciel utilisés, il est possible de retenir d'autres règles pour la détermination de la ligne de seuil.



La règle d'interprétation des résultats est présentée dans le tableau ci-après :

Analyse réalisée avec deux extractions par échantillon

Extraction 1		Extraction 2		Résultat
Ampli 1	Ampli 2	Ampli 1	Ampli 2	
+	+	+	+	Positif
+	-/ind.	+	+	Positif
-/ind.	-/ind.	+	+	Positif
+	-/ind.	+	-/ind.	Extraction d'ADN et PCR à refaire. <u>Cas 1</u> : Si au moins 2 résultats positifs sur 4, le résultat final est interprété comme positif <u>Cas 2</u> : Si au moins 1 résultat positif et 1 résultat indéterminé sur 4, le résultat final est interprété comme indéterminé <u>Cas 3</u> : Si aucun résultat positif et au moins 1 indéterminé, le résultat final est interprété comme indéterminé <u>Cas 4</u> : Si les 4 résultats sur 4 sont négatifs, le résultat final est négatif
+	-/ind.	-/ind.	-/ind.	
-	-	-	-	Négatif
Ind.	Ind.	Ind.	Ind.	Extraction d'ADN et PCR à refaire. <u>Cas 1</u> : Si au moins 2 résultats positifs sur 4, le résultat final est interprété comme positif <u>Cas 2</u> : Si au moins 1 résultat positif et 1 résultat indéterminé sur 4, le résultat final est interprété comme indéterminé <u>Cas 3</u> : Si aucun résultat positif et au moins 1 indéterminé, le résultat final est interprété comme indéterminé <u>Cas 4</u> : Si les 4 résultats sur 4 sont négatifs, le résultat final est négatif

Le résultat final du test est exprimé sous forme qualitative. Les mentions suivantes **sont obligatoires** :

Méthode d'analyse utilisée : « Détection de *Xylella fastidiosa* par PCR en temps réel - méthode MA039 version1 » ou mention équivalente.

Résultat : « négatif », « positif », ou « indéterminé » ou mention équivalente.



10 Caractéristiques de performance de la méthode

La synthèse des caractéristiques de performances de la méthode présentée dans le tableau ci-après est extraite du rapport de caractérisation et de validation de méthode d'analyse établi par le LNR.

Cette validation a été réalisée selon les référentiels suivants :

- Guide méthodologique Anses « Caractérisation des critères de performance des méthodes d'analyse quantitatives en vue de leur validation » LSV/Guide 01 Version 2b
- Guide méthodologique Anses « Statistiques appliquées aux méthodes d'analyse qualitatives en vue de leur validation » LSV/Guide 02 Version 1a

Résultats sur souches pures (cibles et non-cibles)

Caractéristique	Valeur ou résultat obtenu lors de la caractérisation	Principales informations relatives aux modalités de réalisation de la caractérisation
Inclusivité	100%	19 souches appartenant aux sous-espèces <i>X.f. subsp. fastidiosa</i> , <i>X.f. subsp. pauca</i> , <i>X.f. subsp. sandyi</i> , <i>X.f. subsp. multiplex</i> .
Exclusivité	100%	29 souches : 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> .



Résultats sur macérats artificiellement contaminés (validation intra-laboratoire)

Caractéristique de performance	Paramètre		Valeur obtenue à l'issue de la caractérisation
	☉	☉	
Inclusivité	☉	☉	100%
Exclusivité	☉	☉	100%
Sensibilité	Matrice : vigne	Extraction avec automate	94%
		Extraction sans automate	100%
	Matrice : oranger	Extraction avec automate	100%
		Extraction sans automate	100%
	Matrice : olivier	Extraction avec automate	67%*
		Extraction sans automate	50%*
Spécificité	Matrice : vigne	Extraction avec automate	100%
		Extraction sans automate	100%
	Matrice : oranger	Extraction avec automate	100%
		Extraction sans automate	100%
	Matrice : olivier	Extraction avec automate	100%
		Extraction sans automate	100%
Exactitude	Matrice : vigne	Extraction avec automate	96%
		Extraction sans automate	100%
	Matrice : oranger	Extraction avec automate	100%
		Extraction sans automate	100%
	Matrice : olivier	Extraction avec automate	75%*
		Extraction sans automate	63%*
Répétabilité	Matrice : vigne	Extraction avec automate	96%
		Extraction sans automate	100%
	Matrice : oranger	Extraction avec automate	100%
		Extraction sans automate	100%
	Matrice : olivier	Extraction avec automate	100%
		Extraction sans automate	88%
Reproductibilité	Toutes matrices confondues	Extraction avec automate	98%
		Extraction sans automate	96%
Seuil de détection (avec probabilité de détection de 100%)	Matrice : vigne	Extraction avec automate	≈ 10 ³ bact./mL
		Extraction sans automate	≈ 10 ³ bact./mL
	Matrice : oranger	Extraction avec automate	≈ 10 ² bact./mL
		Extraction sans automate	≈ 10 ² bact./mL
	Matrice : olivier	Extraction avec automate	≈ 10 ⁵ bact./mL
		Extraction sans automate	≈ 10 ⁵ bact./mL



*Il est à noter que la valeur du seuil de détection est sujette à d'importante variation selon les espèces végétales travaillées (présence de molécules inhibitrices de la PCR). Par exemple dans le cas de la matrice olivier, une dégradation des performances est observée en présence d'échantillons présentant de faibles concentrations bactériennes due à diminution de la sensibilité et du seuil de détection.

La validation de la présente méthode a été réalisée par comparaison avec des méthodes alternatives. Quelles que soient les matrices analysées, les meilleurs résultats ont été obtenus avec le couple « extraction d'ADN avec le QuickPick™ SML Plant DNA kit (Bio-Nobile) et amplification Harper *et al.* 2010 (avec utilisation du kit d'amplification TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix, No amperase® (Applied Biosystems) utilisé en mode normal) ».



Annexe 1 : programme d'extraction pour l'automate BioSprint15 (Qiagen) automate pour le kit QuickPick™

Plan de plaque

Type de plaque = 5-tube strip (1 ml)

A: - volume = 80 µL, nom = Lysat

- volume = 5 µL, nom = billes magnétiques

- volume = 125 µL, nom = tampon de capture

B: - volume = 250 µL, nom = tampon de lavage

C: - volume = 250 µL, nom = tampon de lavage

D: - volume = 250 µL, nom = tampon de lavage

E: - volume = 50 µL, nom = tampon d'élution

Étapes

1-Capture

Paramètre de l'étape

Nom = Capture

Puits = A

Début de l'étape:

Pas d'action = Oui

Paramètres de capture :

Temps de capture = 10 min 0 s, Vitesse = Moyenne

Fin de l'étape:

Récolte des billes = Oui, nombre de fois = 10

2-Lavage

Paramètre de l'étape

Nom = Lavage 1

Puits = B

Début de l'étape:



Relâche = Oui, temps = 10 s, Vitesse = Moyenne

Paramètre de lavage:

Temps de lavage = 20 s, Vitesse = Moyenne

Fin de l'étape:

Récolte des billes = Oui, nombre de fois = 10

3-Lavage

Paramètre de l'étape

Nom = Lavage 2

Puits = C

Début de l'étape:

Relâche = Oui, temps = 10 s, Vitesse = Moyenne

Paramètre de lavage:

Temps de lavage = 20 s, Vitesse = Moyenne

Fin de l'étape:

Récolte des billes = Oui, nombre de fois = 10

4-Lavage

Paramètre de l'étape

Nom = Lavage 3

Puits = D

Début de l'étape:

Relâche = Oui, temps = 10 s, Vitesse = Moyenne

Paramètre de lavage:

Lavage temps = 20 s, Vitesse = Moyenne

Fin de l'étape:

Récolte des billes = Oui, nombre de fois = 10

5-Elution

Paramètre de l'étape

Nom = Elution



Puits = E

Début de l'étape:

Relâche = Oui, temps = 10 s, Vitesse = Moyenne

Paramètre d'élution:

Temps d'élution = 10 min 0 s, Vitesse = Lent

Paramètres de mise en pause:

Pause pour manipulation = Non

Reprise des billes:

Reprise des billes = Oui, Récolte des billes; nombre de fois = 10, Puits de dépose = D

Nota bene : la version du logiciel à utiliser à la date de parution de la méthode est la **BioSprint 1.1**.



Annexe 2 : programme d'extraction pour l'automate KingFisher™ mL (Thermo Scientific) automate pour le kit QuickPick™

[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 = 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 = 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 = 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 = 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 = 10, disposal well = D

Nota bene : ci-nécessaire, le script informatique du programme est disponible auprès du LNR ou de la société Thermo Scientific. La version du logiciel à utiliser à la date de parution de la méthode est la **Bindtl 3.3.1** (au minimum la version 3.2).



Annexe 3 : programme d'extraction pour l'automate KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processors (Thermo) (Thermo Scientific) automate pour le kit QuickPick™

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 : ci-nécessaire, le script informatique du programme est disponible auprès du LNR ou de la société Thermo Scientific. La version du logiciel à utiliser à la date de parution de la méthode est la **Bindtl 3.3.1** (au minimum la version 3.2)



Bibliographie

- 1 EFSA, Panel on Plant Health (PLH), European Food Safety Authority (EFSA), Scientific Opinion on the risk to plant health posed by *Xylella fastidiosa* in the EU territory, with the identification and evaluation of risk reduction, EFSA Journal 2015;13(1):3989.
- 2 Harper S.J., Ward LI and Clover GRG.. Development of LAMP and real-time PCR methods for the rapid detection of *Xylella fastidiosa* for quarantine and field applications, Phytopathology, 2010; erratum 2013; 12: 1282-1288.
- 3 Legendre B., Molusson D., Olivier V et Poliakoff P., Rapport de caractérisation et de validation de méthode d'analyses, Détection de *Xylella fastidiosa* par PCR en temps réel sur plantes hôtes, Méthode d'analyses MA039, Anses, Laboratoire de la santé des végétaux, septembre 2015.
- 4 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

Liens Internet :

- 1 <https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA/photos>