

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA065 - Version 02

Octobre 2024

Détection de *Xylella fastidiosa* par PCR en temps réel sur insectes vecteurs

Laboratoire de la santé des végétaux

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

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

Historique de la méthode

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

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

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

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

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
v1	Sans objet	Octobre 2020	Version initiale
V2*	Mineure	Octobre 2024	<ul style="list-style-type: none"> – Reformulations et point de vocabulaire : remplacement du terme « prélèvement » par « prise d'essai », « distributeur » au lieu de « dispenseur », « fluorochrome » au lieu de « fluorophore », « gène codant pour l'ARNr » au lieu d' « ADNr ». – Les parties d'insectes non utilisées pour la détection de <i>X. fastidiosa</i> doivent être conservées afin de pouvoir être transmises si besoin au LNR Mandat Tous insectes, acariens phytoparasites et auxiliaires sauf insectes mentionnés au point 6 de l'article 3 de l'arrêté du 30 mars 2023 pour identification complémentaire. – Modification de la concentration finale pour les amorces et la sonde du contrôle interne en vue d'améliorer la sensibilité de la PCR – Ajout d'un paragraphe sur le nettoyage et la désinfection des paillasse et des outils de prises d'essai. – Suppression des références à l'appareil BioSprint 15 (Qiagen) et à ses réactifs spécifiques (obsolescence de l'équipement). – Pour les analyses de groupes, suppression de l'obligation de réaliser la PCR sur extraits d'ADN dilués au 10^{ème}. L'analyse sur extraits dilués est obligatoire uniquement en cas d'inhibition sur les extraits purs. – Prise en compte du changement de nom du fabricant du kit QuickPick : QRET Technologies au lieu de Bio-Nobile – Ajout de résultats d'essais complémentaires dans le rapport de validation concernant l'évaluation du seuil de détection, de la spécificité et de la répétabilité pour les espèces <i>Neophilaenus campestris</i>, <i>N. lineatus</i>, <i>Cicadella viridis</i> et <i>Draeculacephala robinsoni</i>

*La version 2 a fait l'objet d'une consultation du 10/09/2024 au 25/09/2024 sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.

Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

Anses - Laboratoire de la santé des végétaux – Unité Bactériologie, Virologie et détection des OGM

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

Adresse : 7 rue Jean Dixméras - 49044 Angers CEDEX 01

Contact : LSV.UBVO@anses.fr

Les travaux de développement, optimisation, évaluation et validation ont donné lieu à un rapport de caractérisation et de validation de la méthode en mars 2020, complété et mis à jour en 2023-2024.

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

Sommaire

Avant-propos.....	3
Introduction.....	5
Avertissements et précautions de sécurité.....	6
1. Objet et domaine d'application.....	7
2. Documents de référence.....	7
3. Termes, sigles et définitions.....	7
4. Principe de la méthode.....	8
5. Réactifs.....	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.....	13
7. Échantillons.....	15
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons.....	15
7.2 Conservation des échantillons avant analyse.....	15
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse.....	15
8. Mode opératoire.....	16
8.1 Préparation des échantillons pour analyse.....	16
8.2 Extraction de l'ADN total.....	18
Extraction et élution de l'ADN.....	19
Transfert final de l'ADN.....	19
8.3 Test de détection par PCR en temps réel.....	20
9. Résultats.....	22
9.1 Contrôle de la validité des résultats.....	22
9.2 Calculs et expression des résultats.....	22
10. Caractéristiques de performance de la méthode.....	25
11. Annexes.....	29
Annexe A : Programme d'extraction pour l'automate KingFisher™ mL (Thermo Fisher Scientific) automate pour le kit QuickPick™ SML Plant DNA (QRET Technologies).....	29
Annexe B : Programme d'extraction pour l'automate KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processors (Thermo Fisher Scientific) automate pour le kit QuickPick™ SML Plant DNA (QRET Technologies).....	31
Bibliographie.....	33

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.

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 2015, des foyers ont été détectés en Corse et PACA (Var et Alpes-Maritimes) et depuis 2020 en Occitanie (Aude, Tarn, Ariège, Haute-Garonne, Gard, Hérault) sur de nombreuses espèces végétales sauvages ou horticoles.

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. *A contrario*, la symptomatologie n'étant pas caractéristique, des échantillons supposés symptomatiques peuvent présenter de faibles taux de contamination ou trouver l'origine de leurs symptômes dans des causes abiotiques ou d'autres causes biotiques. La gamme d'hôtes de *X. fastidiosa* comprend plus de 690 espèces végétales appartenant à 88 familles botaniques différentes (EFSA, 2023c).

X. fastidiosa est transmise de plante à plante par des insectes piqueurs-suceurs se nourrissant de la sève brute (Hill *et al.*, 1997). Une trentaine d'espèces insectes vecteurs potentiels ont été répertoriées en France, dont 4 en Corse. A ce jour, 3 espèces ont été formellement identifiées en tant que vecteurs de *X. fastidiosa* en Europe (Italie), *Philaenus spumarius*, *Neophilaenus campestris* et *Philaenus italosignus* (Cornara *et al.*, 2016) (Cavaliere *et al.*, 2019). Si cette dernière espèce est endémique de l'Italie, les 2 premières sont répandues en Europe où le cercope des prés (*P. spumarius*) y est très commun. Après acquisition de la bactérie, l'insecte adulte demeure définitivement porteur. *X. fastidiosa* est présente sous forme de biofilms dans la partie antérieure du système digestif de l'insecte (cibarium et précibarium) (OEPP, 2023).

Avertissements et précautions de sécurité

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

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

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.

L'exigence de confinement pour la détention / manipulation de formes viables de *Xylella fastidiosa* doit être en accord avec la réglementation en vigueur dans la région où se situe le laboratoire d'analyse. Si tel est le cas, le laboratoire doit mettre en œuvre les mesures nécessaires pour garantir la non-dissémination de cet organisme dans l'environnement. Cependant les insectes reçus au laboratoire pour analyse sont conditionnés en tubes dans de l'alcool, ce qui garantit l'absence de bactéries vivantes.

1. Objet et domaine d'application

La méthode caractérisée a pour objet la détection de la bactérie phytopathogène *X. fastidiosa* sur les insectes potentiellement vecteurs de celle-ci. Elle a été validée sur les espèces *Philaenus spumarius*, *Neophilaenus campestris*, *Neophilaenus lineatus*, *Cicadella viridis* et *Draeculacephala robinsoni* et s'applique sur tout autre insecte potentiellement vecteur de *X. fastidiosa* de taille similaire, mais ne s'applique pas aux espèces de grande taille (par exemple *Cicada orni*). Elle s'applique sur tête d'insecte isolée du corps.

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 non porteurs de *X. fastidiosa* ou porteurs à un niveau trop faible pour être mis en évidence par la technique utilisée.
- Les échantillons pour lesquels une réponse positive est obtenue sont considérés comme porteurs de *X. fastidiosa*.

La méthode est basée sur une détection par PCR en temps réel en duplex (Harper *et al.*, 2010, erratum 2013 et contrôle interne loos *et al.*, 2009), précédée d'une extraction d'ADN reposant sur l'utilisation de billes métalliques et d'un automate d'extraction.

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

- MOA 022 : Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques: PCR (Polymerase Chain Reaction), RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) et PCR temps réel. Détection et identification des organismes phytopathogènes

3. Termes, sigles et définitions

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

4. Principe de la méthode

Le principe de la méthode est présenté dans la figure 1 ci-dessous :

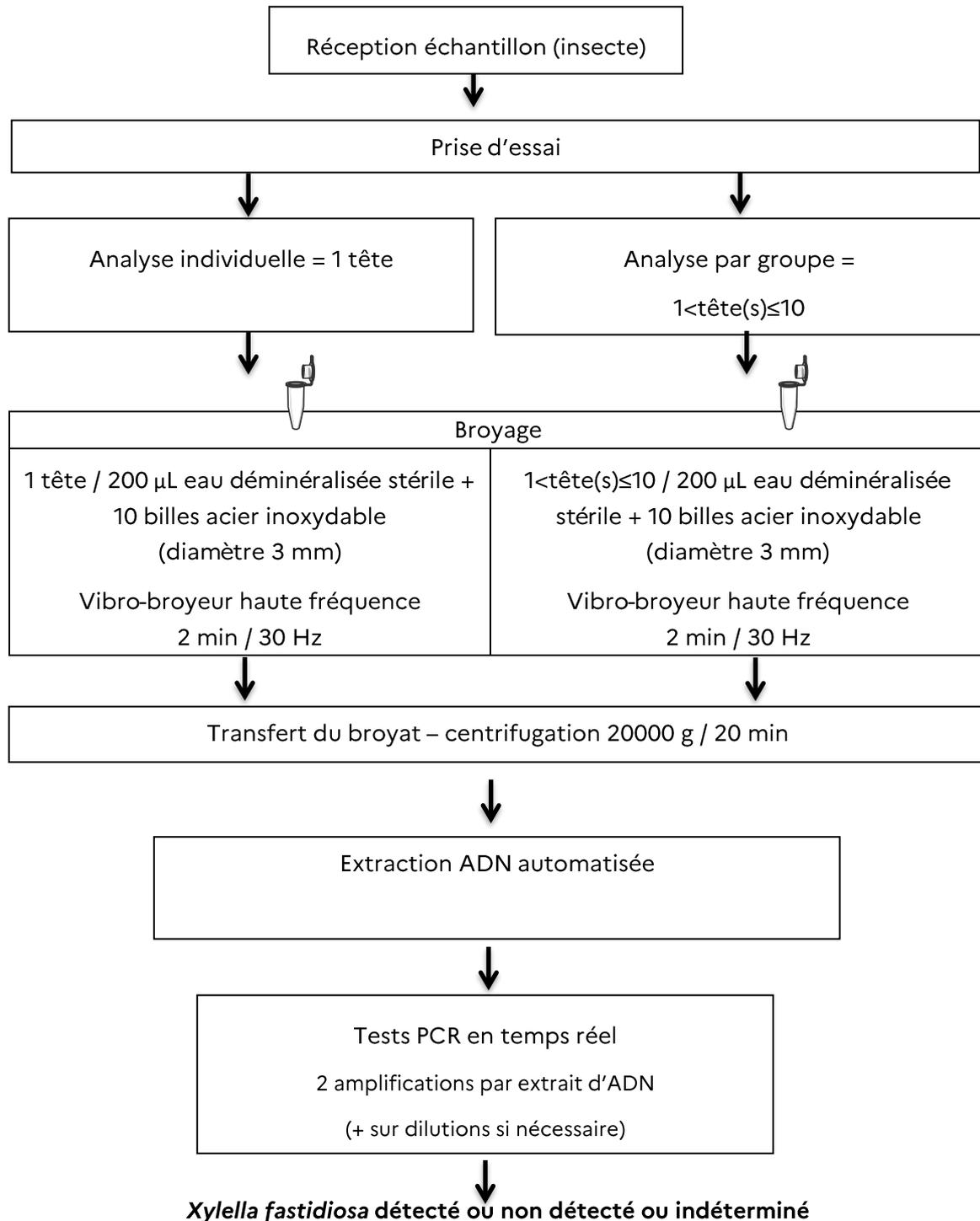


Figure 1 : Principe de la méthode

5. Réactifs

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés 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 de conservation qu'il jugera optimales.

5.1 Eau

Préparation d'échantillons

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

Analyse de PCR en temps réel

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

5.2 Kit d'extraction d'ADN

L'ADN total des échantillons est extrait et purifié à l'aide d'un kit d'extraction d'ADN disponible dans le commerce. Le kit d'extraction validé par le LNR pour cette méthode est le kit QuickPick™ SML Plant DNA (QRET Technologies, Réf. QuickPick™ SML Plant DNA kit, 96 preps : 53022).

5.3 Oligonucléotides

Harper et al., 2010 erratum 2013

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

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

Cible des amorces XF-F et XF-R et de la sonde XF-P : 16S rRNA processing protein rimM (XF_0108)

9 / 31 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 : gène codant pour l'ARNr 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).

Les fluorochromes utilisés pour chaque sonde peuvent être modifiés, sous réserve que pour chaque sonde le fluorochrome extincteur soit adapté au rapporteur associé, que d'une sonde à l'autre les fluorochromes 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 (Thermo Fisher Scientific Référence catalogue: 4352042).

5.5 Autres réactifs

- BSA (qualité biologie moléculaire - attention: ne pas utiliser de BSA acétylée)
- Produits courants de désinfection bactérienne / décontamination des ADN d'un laboratoire de microbiologie et de biologie moléculaire

5.6 Autres consommables 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.

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. 200 µL d'eau de qualité analytique stérile subiront donc toutes les phases de l'analyse dès la mise en tube pour broyage, 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 interne de la qualité de l'extraction d'ADN et de la présence d'inhibiteur est réalisé pour chaque prise d'essai: il s'agit d'un contrôle interne universel eucaryote. La cible étant présente dans la matrice (insecte), il permet de contrôler la qualité de la manipulation ainsi que le bon fonctionnement du matériel et permet également de mettre en évidence d'éventuelles inhibitions. 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 d'insecte est présent dans un extrait, sans effet inhibiteur suffisant. Toutefois, les prises d'essai qui sont positives pour le test ciblant le 16S rRNA processing protein rimM (XF_0108) ne nécessiteront pas systématiquement de contrôle de la qualité d'ADN. **Remarque importante**: ***Pour les PCR réalisées avec l'espèce Draeculacephala robinsoni, l'analyse des résultats du contrôle interne n'est pas obligatoirement requise du fait de l'inhibition récurrente de la PCR pour la cible 18S. Ces inhibitions n'affectent pas la détection de la cible Xylella fastidiosa.***

De ce fait, pour cette d'espèce, il est recommandé d'utiliser un contrôle positif de processus contenant l'organisme cible afin de valider l'étape d'extraction des acides nucléiques et de palier à une éventuelle inhibition du contrôle interne. Il n'est pas nécessaire que ce contrôle soit réalisé avec la matrice « *Draeculacephala robinsoni*. Ce contrôle est constitué par exemple d'une solution d'ADN cible ou d'une suspension bactérienne cible inactivée d'une concentration en cible correspondant à environ 10⁵ cellules/mL. Ce contrôle subit toutes les étapes du protocole d'extraction.

- **Un contrôle positif de PCR** (ou témoin positif d'amplification) sera systématiquement introduit lors de chaque réaction de PCR en temps réel. Une prise d'échantillon composée d'une solution d'acides nucléiques cibles (ex : lysat bactérien) subira donc toutes les phases de l'analyse à partir de la préparation du mélange réactionnel de PCR afin de vérifier la qualité de l'amplification ainsi que la qualité de la manipulation et le bon fonctionnement du matériel.
- **Un contrôle négatif de PCR** (ou témoin négatif d'amplification) sera systématiquement introduit lors de chaque réaction de PCR en temps réel. Une prise d'échantillon " eau ultra pure " subira donc toutes les phases de l'analyse à partir de la préparation du mélange réactionnel de PCR pour vérifier l'absence de contamination lors de cette phase.

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

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

Les contrôles doivent donner les résultats escomptés avant de valider les résultats de l'analyses.

Dans le cas des analyses, où le contrôle interne donne un résultat négatif, le laboratoire doit réaliser une nouvelle amplification sur la solution d'ADN diluée au 10^{ème}.

6. Appareillage et matériels

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

Afin d'alléger la lecture de la méthode, seules les valeurs cibles des grandeurs mesurées sont indiquées dans le corps du texte, en unités du système international ou unités dérivées. Les valeurs de prescription et 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 : Prescriptions et erreurs maximales tolérées

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

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

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

Préparation des échantillons

- Vibro-broyeur permettant d'atteindre une fréquence de 30 Hz (exemple : MM400 (Retsch))
- Billes en acier inoxydable de 3 mm de diamètre
- Portoir magnétique (par exemple : DynaMag™-2)
- Loupe binoculaire (grossissement env. X10) et système d'éclairage adapté
- Pipette automatique (plage de mesure de 1 à 5 mL) et/ou distributeur
- Pinces pour l'entomologie (pinces de dissection)
- Scalpel

Extraction d'ADN selon le protocole QuickPick™

- 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 Kit (QRET Technologies).
- 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) et 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 et ordinateur de pilotage capables de mesurer la fluorescence des fluorochromes employés (méthode validée avec l'appareil C1000 Touch thermal cycler / Bloc CFX96 Real optics module BIORAD)

Stockage des échantillons et des ADN

- Congélateur (température ≤ -18°C)
- Enceinte réfrigérée (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 stockés dans de l'éthanol 96% vol. Le transport peut être réalisé à température ambiante. Si les échantillons sont stockés avant d'être envoyés au laboratoire, ils doivent être conservés à une température \leq à -18°C .
- Chaque échantillon est conditionné 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.
- Un échantillon peut être composé d'un ou plusieurs insecte(s).
- Le transport peut être réalisé à température ambiante.

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

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

En attente de traitement, l'échantillon devra être conservé à une température \leq à -18°C sans limitation de temps.

7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

L'analyse est partiellement destructive. Les extraits d'ADN sont conservés. **Dans la mesure du possible, les parties d'insectes non utilisées pour la détection de *X. fastidiosa* doivent également être conservées afin de pouvoir être transmises en cas de besoin au LNR Mandat « Tous insectes, acariens phytoparasites et auxiliaires sauf insectes mentionnés au point 6 de l'article 3 de [l'arrêté du 30 mars 2023](#) » pour identification complémentaire. Les reliquats sont conservés dans de l'éthanol 96% à température ambiante pour une durée d'un an après rendu du résultat d'analyse.**

Cas d'un échantillon négatif : sauf mention contraire explicite les laboratoires doivent conserver les reliquats d'extraits d'ADN à une température \leq à -18°C 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 : Les reliquats d'extraits d'ADN doivent être conservés à une température \leq à -18°C pendant une durée minimale de 12 mois, sauf pour les extraits éventuellement transmis au laboratoire de référence, à qui est alors transférée la charge de conservation des reliquats.

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

Une prise d'essai est constituée :

- Pour une analyse individuelle : 1 tête
- Pour une analyse par groupe (1 tête < N ≤ 10 têtes) : N têtes



Figure 2 – Photo du matériel nécessaire à l'ablation de la tête d'insecte (Source: A. Dintheer LSV Angers, 2018)



Figure 3 – Photo de *P. spumarius* observé à la loupe binoculaire (Source: A. Dintheer LSV Angers, 2018)

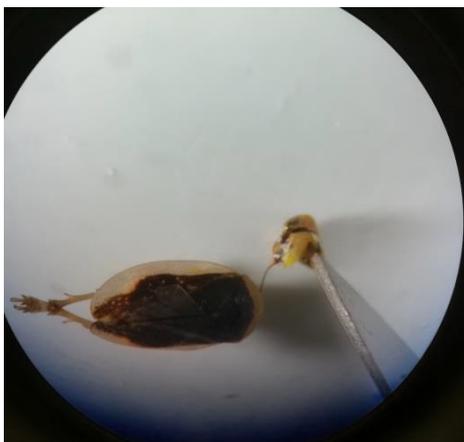


Figure 4 – Photo de *P. spumarius* observé à la loupe binoculaire après ablation de la tête (Source: A. Dintheer LSV Angers, 2018)

- L'insecte est déposé sur un papier absorbant pour éliminer l'éthanol.
- L'insecte est placé sur un autre papier absorbant dans un récipient type fond de boîte de Petri et placé sous une loupe binoculaire.
- Le corps de l'insecte est tenu avec des pinces, et le scalpel est inséré entre la tête et le thorax de l'insecte.
- La tête est séparée du thorax en appliquant une légère pression avec la pointe du scalpel.
- La tête ou le groupe de têtes est déposé dans **un microtube 2 mL**
- 200 μ L d'eau déminéralisée stérile sont déposés dans le microtube 2 mL.
- 10 billes en acier inoxydable sont déposées dans le microtube 2 mL.
- Le tube est ensuite déposé dans le portoir du vibro-broyeur.
- Le broyage est réalisé pendant 2 min à une fréquence d'agitation de 30 Hz.
- Le tube est ensuite centrifugé rapidement de manière à faire tomber les gouttelettes de broyat au fond du tube.
- La totalité du broyat est prélevée à la pipette et déposée dans **un microtube de 1,5 mL**.
- Un portoir magnétique peut être utilisé pour faciliter la récupération du broyat.

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

Les billes d'acier peuvent être nettoyées en vue d'une utilisation ultérieure en les faisant tremper environ 2 min dans un bain d'hypochlorite de sodium (2,6% de chlore actif) et ensuite rincées à l'eau puis séchées. Il est également possible de les exposer ensuite à un rayonnement ultra-violet après le bain.

Entre chaque échantillon, changer les coupelles de pesée et nettoyer/décontaminer les petits matériels (scalpels, pinces, 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 rincer abondamment à l'eau déminéralisée (élimination des traces d'ADN) ou utiliser un produit ayant une action équivalente sur l'ADN. Nettoyer les paillasses régulièrement avec de l'hypochlorite de sodium

ou avec un produit ayant une action équivalente afin d'éviter les contaminations croisées (destruction des traces d'ADN).

8.2 Extraction de l'ADN total

Ce protocole nécessite l'appareil 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 (QRET Technologies) présentés dans le tableau 2 ci-après :

Tableau 2 : composants du kit QuickPick™ SML Plant DNA (QRET Technologies)

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.

- Mettre en chauffe le thermobloc ou le bain-à-sec à 65°C.
- Centrifuger les tubes 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 prises d'essai au congélateur.

- Reprendre le culot avec 37,5 µL de tampon de lyse et 2,5 µL de protéinase K. Le suspendre en utilisant un agitateur de type Vortex ou si nécessaire avec une pipette par aspiration / refoulement (il est possible de reprendre le culot avec 40 µL d'une solution en mélange de tampon de lyse (37,5 µL) et de protéinase K (2,5 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 négatif de processus est inséré dans chaque série lors de l'utilisation de l'automate.

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

Préparation des barrettes :

- Remettre les billes magnétiques en suspension par agitation manuelle et/ou pipetage (ne pas utiliser un agitateur de type Vortex).
- 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 tableau 3 suivant :

Tableau 3 : Plan de dépôt des réactifs

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)	62,5	2,5	125	125	125	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. 40 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 A.

Transfert final de l'ADN

- Sortir le plateau et transférer l'ADN dans un nouveau tube ou une barrette. La solution d'ADN est alors prête à l'emploi. Il est possible de stocker la solution d'ADN plusieurs jours dans une enceinte réfrigérée 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 B.

Il est possible de stocker la solution d'ADN plusieurs jours dans une enceinte réfrigérée avant analyse, puis au congélateur pendant plusieurs mois.

8.3 Test de détection par PCR en temps réel

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

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

La composition du mélange réactionnel pour une réaction est présentée dans le tableau 4 ci-après :

Tableau 4 : composition du mélange réactionnel

Réactifs	Concentration finale ou volume final
Eau ultra pure	qsp 18 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	0,10 μ M
Amorce sens 18S uni-F	0,3 μ M
Amorce antisens 18S uni-R	0,3 μ M
Sonde 18S uni-P	0,10 μ M
BSA	0,3 μ g/ μ L
Mélange réactionnel	18 μ L
Extrait d'ADN	2 μL
Volume final	20 μ L

Les différents paramètres de l'amplification par PCR en temps réel pour la détection de *X. fastidiosa* sont présentés dans le tableau 5 ci-après:

Tableau 5 : paramètres d'amplification

Etape	Température	Durée programmée	Nombre de cycle
Activation de l'ADN polymérase	50°C	2 min	1
	95°C	10 min	
Dénaturation	94°C	10 s	40
Hybridation / Elongation	62°C	40	

9. Résultats

9.1 Contrôle de la validité des résultats

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

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

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

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 \leq à 38.
- Le contrôle interne a généré une courbe de fluorescence de type exponentielle et une valeur de Ct \leq à 30 (condition obligatoire uniquement pour les échantillons négatifs pour la cible *Xylella fastidiosa*).

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

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 la valeur de cut-off de la méthode est 38. Selon Cunty *et al.*, (2020), une valeur de Ct de 38 correspond à une charge bactérienne de 29 cellules de *X. fastidiosa* par tête de *P. spumarius*.

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

Tableau 6 : règle de cut-off applicable pour la cible *X. fastidiosa*

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

Tableau 6 bis : règle de cut-off applicable pour la cible 18S (contrôle interne)

Valeur de Ct obtenue pour le réplicat	Statut du réplicat
$Ct \leq 30$	Positif
$Ct > 30$	Négatif
Absence de Ct	Négatif

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

Tableau 7 : interprétation des résultats test *X. fastidiosa*

Résultat final Cible <i>X. fastidiosa</i>	Action	Interprétation / marche à suivre / Expression des résultats
+/+	Fin	<i>X. fastidiosa</i> détecté
+/-	Refaire le test duplex	Suite au nouveau test duplex, si résultat +/+ ou +/-, <i>X. fastidiosa</i> détecté Si résultat -/-, interpréter le test 18S uni
-/-	Interpréter le test 18S uni	Cf. tableau 8 test 18S uni

Tableau 8 : interprétation des résultats du test 18S uni

Résultat final Cible 18S uni	Action	Interprétation / marche à suivre / Expression des résultats
+/+	Fin	<i>X. fastidiosa</i> non détecté
+/-	Refaire test duplex sur ADN dilué au 10 ^{ème} et non dilué	Suite au nouveau test duplex, les résultats sur les ADN dilués sont interprétés comme ceux obtenus sur les ADN non dilués Si +/- ou -/- à nouveau obtenu pour 18S uni, Fin : Résultat indéterminé (préciser la cause sur le dossier analytique et sur le rapport : présence d'effet inhibiteur)
-/-	Refaire test duplex sur ADN dilué au 10 ^{ème} et non dilué	Suite au nouveau test duplex, les résultats sur les ADN dilués sont interprétés comme ceux obtenus sur les ADN non dilués Si +/- ou -/- à nouveau obtenu pour 18S uni, Fin : Résultat indéterminé (préciser la cause sur le dossier analytique et sur le rapport : présence d'effet inhibiteur)

Ces tableaux décisionnels sont également valables en cas d'introduction de dilution au 1/10^{ème} de l'extrait d'ADN. Ainsi, en présence d'inhibiteurs mise en évidence par l'absence d'amplification avec le contrôle interne (renouvellement de l'amplification), l'interprétation est réalisée soit sur la série des extraits dilués soit sur la série des extraits non dilués. La série choisie est celle amenant au nombre maximum de positif(s).

Remarque: dans le cas où le résultat pour un échantillon est interprétable uniquement après dilution au 1/10^{ème} de l'extrait d'ADN, il n'est pas nécessaire de le préciser sur le rapport d'analyses.

Expression des résultats sur le rapport d'analyse

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

10. Caractéristiques de performance de la méthode

La synthèse des caractéristiques de performance de la méthode est extraite des rapports de validation suivants : version1 – MA065v1 (mars 2020) et version 1 MA065v2 (2024) rédigé par le LNR Anses - Laboratoire de la santé des végétaux – Unité bactériologie, virologie et détection des OGM.

Résultats sur souches pures

Le tableau 9 ci-après présente les résultats d'inclusivité et d'exclusivité :

Tableau 9 : Valeurs des critères de performance sur souches pures

Caractéristique	Valeur ou résultat obtenu lors de la caractérisation	Principales informations relatives aux modalités de réalisation de la caractérisation
Inclusivité	100%	<p><u>15 souches cibles :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 3 <i>X. f.</i> subsp. <i>fastidiosa</i> - 3 <i>Xf.</i> subsp. <i>pauca</i> - 2 <i>X.f.</i> subsp. <i>sandyi</i> - 6 <i>X.f.</i> subsp. <i>multiplex</i> - 1 <i>X.f.</i> subsp. <i>morus</i>
Exclusivité	100%	<p><u>40 souches non cibles :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 1 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> - 1 <i>Clavibacter insidiosus</i> - 1 <i>Erwinia amylovora</i> - 1 <i>Pseudomonas fluorescens</i> - 1 <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> - 1 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aesculi</i> - 1 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>mori</i> - 1 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> - 1 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>persicae</i> - 1 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> - 1 <i>Pseudomonas viridiflava</i> - 1 <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> - 1 <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i> - 1 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>aurantifolia</i> - 1 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>viticola</i> - 1 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> - 1 <i>Xanthomonas fragariae</i> - 1 <i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i> - 1 <i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>hederae</i> - 1 <i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i> - 1 <i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>graminis</i> - 1 <i>Xylophilus ampelinus</i> - 1 Phytoplasme Bois noir - 1 Phytoplasme flavescence dorée - 5 bactéries saprophytes isolées de <i>Lavandula</i> sp. - 5 bactéries saprophytes isolées de <i>Rosmarinus officinalis</i> - 6 bactéries saprophytes isolées de <i>Westringia fruticosa</i> <p>Concentration des suspensions bactériennes $\approx 10^7$ bact./mL</p>

Résultats sur broyats de tête(s) d'insecte(s) *Philaenus spumarius* sains et artificiellement contaminés

La méthode a été évaluée sur des échantillons constitués d'une tête de *P. spumarius* (analyse individuelle) ou 10 têtes (analyse par groupe) broyées dans de l'eau déminéralisée stérile, artificiellement contaminées par des gammes décimales de suspensions bactériennes lysées et calibrées (souche *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* LNPV 24.34 (CFBP 7970)). Les concentrations finales ont été de 1.10^2 à 1.10^5 cellules/tête d'insecte selon les modalités d'essais. La contamination des broyats a été réalisée avant l'étape de lyse.

Afin de déterminer la concentration des suspensions bactériennes, celles-ci ont été, préalablement à la lyse, dénombrées systématiquement soit par microscopie selon la technique de l'immunofluorescence avec utilisation d'un antisérum spécifique, soit par PCR digitale.

Pour la méthode d'analyse individu par individu, trois extractions ont été réalisées pour chaque concentration bactérienne et 3 amplifications ont été réalisées par extraction. Les essais ont été réitérés sur 3 jours différents.

Pour la méthode sur groupe de 10 individus, trois extractions ont été réalisées pour chaque concentration bactérienne et 3 amplifications ont été réalisées par extraction. Les essais ont été réitérés sur 2 jours différents. Pour les matrices non dopées, une extraction et trois amplifications ont été réalisées. Les essais n'ont pas été réitérés sur 3 jours, faute de spécimens de *P. spumarius*.

La caractérisation de la méthode a été réalisée sur un seul appareil (C1000 Touch thermal cycler / Bloc CFX96 Real optics module, BIORAD).

Résultats complémentaires (2024) sur broyats de tête(s) d'insecte(s) de *Neophilaenus campestris*, *N. lineatus*, *Cicadella viridis* et *Draeculacephala robinsoni* sains et artificiellement contaminés

La méthode a été évaluée sur des échantillons constitués d'une tête d'insecte (analyse individuelle uniquement) broyées dans de l'eau déminéralisée stérile, artificiellement contaminées par des gammes décimales de suspensions bactériennes lysées et calibrées (souche *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* LNPV 24.34 (CFBP 7970)). Les concentrations finales testées ont été de 2.10^2 à 2.10^5 cellules/tête d'insecte selon les modalités d'essais. La contamination des broyats a été réalisée avant l'étape de lyse.

Afin de déterminer la concentration de la suspension bactérienne, celle-ci a été, préalablement à la lyse, quantifiée par PCR digitale.

Trois extractions ont été réalisées pour chaque concentration bactérienne et chaque espèce et 3 amplifications ont été réalisées par extraction. Les essais ont été réalisés sur un seul jour.

Les valeurs des caractéristiques de performance sont présentées dans le tableau ci-après.

Tableau 10: Valeurs des caractéristiques de performance

Caractéristique de performance	Matrice	Valeur obtenue à l'issue de la caractérisation	Valeur cible prédéterminée (cahier des charges)	Conclusion(s)
Inclusivité	Souches pures	100%	100%	Conforme
Exclusivité	Souches pures	100%	100%	Conforme
Seuil de détection (au taux de détection de 100%)*	Analyse individuelle de <i>P. spumarius</i> , <i>Cicadella viridis</i> , <i>Neophilaenus campestris</i> , <i>Neophilaenus lineatus</i> , <i>Draeculacephala robinsoni</i>	≈10 ³ cell./tête	Seuil de détection le plus faible	Conforme
	Analyse en groupe de 10 individus de <i>P. spumarius</i>	Equivalent 1 insecte contaminé à 10 ³ cell./tête parmi 9 insectes sains		Conforme
Sensibilité au-dessus du seuil de détection	Analyse individuelle de <i>P. spumarius</i>	100%	Méthode la plus sensible possible et absence d'interaction avec la matrice	Conforme
	Analyse en groupe de 10 individus de <i>P. spumarius</i>	100%		Conforme
Spécificité	Analyse individuelle de <i>P. spumarius</i>	100%	Méthode la plus spécifique possible et absence d'interaction avec la matrice	Conforme
	Analyse en groupe de 10 individus de <i>P. spumarius</i>	100%		Conforme
	Analyse individuelle : <i>Cicadella viridis</i> , <i>Neophilaenus campestris</i> , <i>Neophilaenus lineatus</i> , <i>Draeculacephala robinsoni</i>	100%		Conforme

Exactitude	Analyse individuelle de <i>P. spumarius</i>	100%	>70%	Conforme
	Analyse en groupe de 10 individus de <i>P. spumarius</i>	100%		Conforme
Répétabilité	Analyse individuelle de <i>P. spumarius</i>	100%	> 80%	Conforme
	<i>P. spumarius</i> : analyse groupe de 10 individus	100%		Conforme
	Analyse individuelle de : <i>Cicadella viridis</i> <i>Neophilaenus campestris</i> <i>Neophilaenus lineatus</i> <i>Draeculacephala robinsoni</i>	100%		Conforme
Reproductibilité	Analyse individuelle de <i>P. spumarius</i>	100%	> 80%	Conforme
	Analyse en groupe de 10 individus de <i>P. spumarius</i>	100%		Conforme

11. Annexes

Annexe A : Programme d'extraction pour l'automate KingFisher™ mL (Thermo Fisher Scientific) automate pour le kit QuickPick™ SML Plant DNA (QRET Technologies)

Tableau 11: Programme de l'automate d'extraction KingFisher™ mL (Thermo Fisher Scientific) avec le kit QuickPick™ SML Plant DNA

Reagent info

A (Binding)			
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
Sample	40	-	Reagent
Beads	3	-	Reagent
Binding buffer	63	-	Reagent
B (Wash 1)			
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
Wash buffer	125	-	Reagent
C (Wash 2)			
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
Wash buffer	125	-	Reagent
D (Wash 3)			
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
Wash buffer	125	-	Reagent
E (Elution)			
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
Elution buffer	50	-	Reagent

Steps data

 Tip1	Tip comb		
	Binding	96 DW	(A) - Binding
	Beginning of step	Precollect	No
		Release beads	Yes
	Mixing / pause:	Mixing time, speed	00:10:00, Medium
		Pause for manual handling	No
	End of step	Postmix	No
	Collect count	5	
	Collect time [s]	10	
	Wash 1	96 DW	(B) - Wash 1
	Beginning of step	Precollect	No
		Release time, speed	00:00:10, Medium
	Mixing / pause:	Mixing time, speed	00:00:20, Medium
		Pause for manual handling	No
	End of step	Postmix	No
	Collect count	5	
	Collect time [s]	10	
	Wash 2	96 DW	(C) - Wash 2
	Beginning of step	Precollect	No
		Release time, speed	00:00:10, Medium
	Mixing / pause:	Mixing time, speed	00:00:20, Medium
		Pause for manual handling	No
	End of step	Postmix	No
	Collect count	5	
	Collect time [s]	10	
	Wash 3	96 DW	(D) - Wash 3
	Beginning of step	Precollect	No
		Release time, speed	00:00:10, Medium
	Mixing / pause:	Mixing time, speed	00:00:20, Medium
		Pause for manual handling	No
	End of step	Postmix	No
	Collect count	5	
	Collect time [s]	10	
	Elution	96 DW	(E) - Elution
	Beginning of step	Precollect	No
		Release time, speed	00:00:10, Medium
	Mixing / pause:	Mixing time, speed	00:10:00, Slow
		Pause for manual handling	No
	End of step	Postmix	No
	Collect count	5	
	Collect time [s]	10	
	Leave	96 DW	(D) - Wash 3
		Release time, speed	00:00:05, Fast

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 B : Programme d'extraction pour l'automate KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processors (Thermo Fisher Scientific) automate pour le kit QuickPick™ SML Plant DNA (QRET Technologies)

Tableau 12: Programme de l'automate d'extraction KingFisher™ Flex (Thermo Fisher Scientific) avec le kit QuickPick™ SML Plant DNA

Reagent info

Tip Comb		96 standard plate	
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
-	-	-	-
Elution		96 standard plate	
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
Elution buffer	50	-	Reagent
Binding		96 DW plate	
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
Lysat	40	-	Reagent
magnetic particles	3	-	Reagent
binding buffer	63	-	Reagent
Wash1		96 DW plate	
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
Wash buffer	125	-	Reagent
Wash 2		96 DW plate	
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
Wash Buffer	125	-	Reagent
Wash 3		96 DW plate	
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
Wash Buffer	125	-	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.

Bibliographie

- Cavalieri V., Altamura G., Fumarola G., di Carolo M., Saponari M., Cornara D., Bosco D. and Dongiovanni C., Transmission of *Xylella fastidiosa* Subspecies *Pauca* Sequence Type 53 by Different Insect Species (2019), *Insects*, 10, 324.
- Cornara Daniele, Sicard Anne, Zeilinger AR, Porcelli Francesco, Purcell AH and Almeida RPP. Transmission of *Xylella fastidiosa* to grapevine by the meadow spittlebug (2016), *Phytopathology*, Vol 106, No 11, 1285-1290.
- Cuntz A., Legendre B., De Jerphanion P., Juteau V., Forveille A., Germain J.F., Ramel J.M., Reynaud P., Olivier V., Poliakoff F., (2020), *Xylella fastidiosa* subspecies and sequences types detected in *Philaenus spumarius* and in infected plants in France share the same locations, *Plant Pathology*, 00 : 1-14.
- Dintheer A., Amélioration de la méthode de détection de *Xylella fastidiosa* sur insectes vecteurs (2018), Anses LSV, Licence professionnelle Gestion de la santé des plantes 2017/2018, Université d'Angers.
- EFSA (European Food Safety Authority), Gibin D, A. Gutierrez Linares Pasinato L and Delbianco A, SCIENTIFIC REPORT, Update of the *Xylella* spp. host plant database – systematic literature search up to 30 June 2023, *EFSA Journal*, 2023; 21:e8477.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), EPPO Standards PM 7 – Diagnostics PM 7/24 (5) *Xylella fastidiosa*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 2023; 00: 1–72.
- Harper S.J., Ward L.I. and Clover G.R.G.. Development of LAMP and real-time PCR methods for the rapid detection of *Xylella fastidiosa* for quarantine and field applications (2010, erratum 2013) *Phytopathology*, 12, 1282-1288.
- Hill B. L. and Purcell A. H., Populations of *Xylella fastidiosa* in Plants Required for Transmission by an Efficient Vector (1997), *Phytopathology*, Vol. 87, No. 12, 1197-1201.
- 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 (2009), *Phytopathology*, 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 (2014), *Journal of Plant Pathology*, 96 (1), 7-14.
- 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. (1987), *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37,136-143