

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA020 - Version 3

Février 2017

Détection de *Bursaphelenchus xylophilus* par PCR temps réel sur bois de conifères

Laboratoire de la santé des végétaux

Laboratoire national de référence [Nématodes phytoparasites sur toutes matrices]



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			Version initiale (initialement codifiée sous MOA 020 partie A)
v2	mineures	Juillet 2016	Modifications mineures suivantes : Changement de format (MOA → MA ANSES) et de code identifiant (suppression du « O ») Mise à jour des documents de références Changement de la consigne de température de conservation des échantillons avant analyse §7.2 Description détaillée des modalités d'extraction d'ADN Correction de l'interprétation du témoin négatif de PCR Formulation du résultat d'analyse. Ajout du cas « test non interprétable » omis dans la version précédente, §9.2.4 et mise à jour du principe d'analyse (§ 4) en conséquence Ajout du § 10 « Caractéristiques de performance de la méthode »
V3	mineures	Février 2017	Correction du schéma de la méthode Ajout des erreurs maximales tolérées au §6 Ajustement des modalités d'extraction à la documentation fournisseur (précision éthanol (96-100%) , tampon AE ou eau distillée , et indication des vitesses de centrifugation en « g » et non en « rpm ». Suppression de données inutiles dans le §10 «Caractéristiques de performance de la méthode ».



Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

Anses - Laboratoire de la santé des végétaux – Unité de Nématologie

Laboratoire National de Référence : Nématodes phytoparasites sur toutes matrices

Adresse : Domaine de la Motte au Vicomte

BP 35327

35653 Le Rheu Cedex

France

Tél : +33(0)2 99 30 48 28

Contact : rennes.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	8
5.1 Eau	9
5.2 Kits d'extraction d'ADN.....	9
5.3 Oligonucléotides.....	9
5.4 Pré-mix commercial.....	9
5.5 Contrôles	9
5.6 Autres consommables à usage unique.....	10
6 Appareillage et matériels	10
7 Échantillons.....	11
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	11
7.2 Conservation des échantillons avant analyse.....	11
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse	12
8 Mode opératoire.....	12
8.1 Extraction des nématodes à partir du bois	12
8.2 Conditionnement de l'extrait	12
8.3 Extraction d'ADN	13
8.4 Détection par PCR temps réel	14
9 Résultats.....	15
9.1 Validation et expression des résultats	15
9.1.1 Validation de l'amplification	15
9.1.2 Validation de l'extraction d'ADN	15
9.1.3 Interprétation des résultats	15
9.1.4 Formulation du résultat d'analyse	17
10 Caractéristiques de performance de la méthode	17
Bibliographie.....	19



Introduction

Le nématode du pin, *Bursaphelenchus xylophilus*, est un parasite inféodé aux conifères et causant la maladie dite « Maladie du dépérissement du pin » (ou « pine wilt disease »). Il se rencontre principalement sur *Pinus*, mais d'autres conifères tels que *Larix*, *Abies*, *Cedrus*, *Chamaecyparis*, *Pseudotsuga* et *Picea* peuvent aussi être hôtes de ce nématode.

Les symptômes visibles causés par la présence de *B. xylophilus* dans l'arbre sont le jaunissement et le flétrissement des aiguilles. Il peut provoquer la mort de l'arbre contaminé dans l'année en bloquant la circulation de la sève dans le tronc.

Cet organisme nuisible est transmis d'un arbre à un autre par un insecte xylophage du genre *Monochamus*. Toutefois, le risque de dissémination à grandes distances le plus important est le transport de bois ou de végétaux contaminés par le nématode, seul ou accompagné de son vecteur.

Ce nématode a été décrit pour la 1ère fois en 1934 en Amérique du Nord. Il n'a jamais causé de dégâts sur ce continent en raison de la résistance naturelle des pins. Il a ensuite été introduit au Japon puis en Chine, en Corée et à Taïwan. Son éradication n'a jamais été atteinte dans ces pays. Puis en 1999, il a été découvert au Portugal, où l'introduction a sans doute eu lieu peu d'années auparavant. Depuis 2008, plusieurs foyers ont été détectés au Portugal et en Espagne. A l'heure actuelle, *B. xylophilus* n'a jamais été détecté en France sur peuplements.

B. xylophilus est réglementé au sein de l'Union européenne (directive 2000/29/CE).

L'application de cette méthode s'inscrit dans le cadre de la surveillance du nématode du pin pour lutter contre la propagation de ce ravageur en Europe conformément à la directive européenne 2012/535/UE du 26 septembre 2012.



Avertissements et précautions de sécurité

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

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



1 Objet et domaine d'application

La présente méthode décrit les modalités de détection du nématode du pin, *Bursaphelenchus xylophilus*, à partir du bois de conifères. Elle repose sur une extraction du nématode à partir du bois puis sur la détection de ce dernier directement dans l'extrait de bois en utilisant la technique par PCR temps réel.

Objets susceptibles d'être soumis à analyse

La méthode est applicable aux bois et écorces de conifères sous forme de copeaux ou morceaux de bois.

2 Documents de référence

- [1] MOA 012 - Extraction, détection et identification morphobiométrique des nématodes phytoparasites.
- [2] MOA 022 : Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques : PCR (Polymerase Chain Reaction), RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) et PCR temps réel. Détection des organismes phytopathogènes
- [3] Directive 2000/29/CE du Conseil du 8 mai 2000 - Directive 2000/29/CE du Conseil du 8 mai 2000 concernant les mesures de protection contre l'introduction dans la Communauté d'organismes nuisibles aux végétaux ou aux produits végétaux et contre leur propagation à l'intérieur de la Communauté Journal officiel n° L 169 du 10/07/2000 p. 0001 – 0022.
- [4] GLO 001- Glossaire des termes techniques en vigueur au LNPV.
- [5] Rapport d'évaluation d'outils moléculaires de détection de *Bursaphelenchus xylophilus* sur extrait de bois. Septembre 2014, version 2

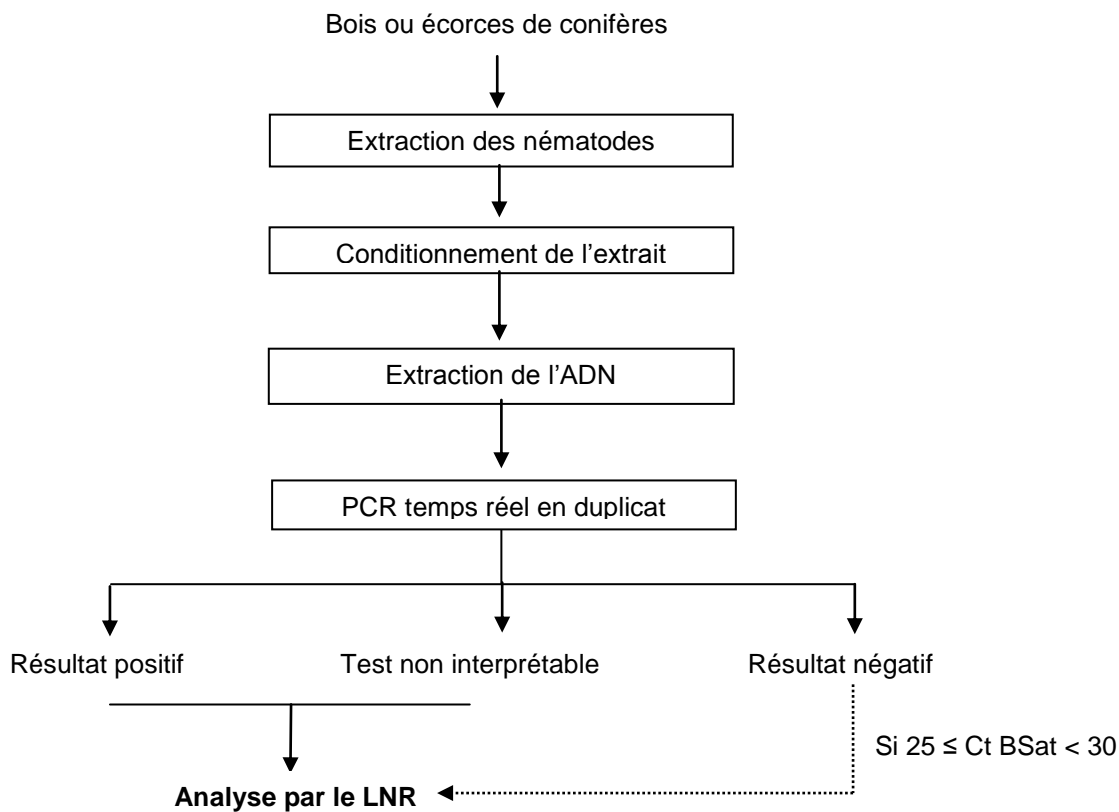
3 Termes, sigles et définitions

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



4 Principe de la méthode

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



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. 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. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats de performance.

En règle générale, le manipulateur doit veiller (par l'utilisation de produits et consommables certifiés, nettoyage, stérilisation ou tout autre traitement approprié) à l'absence dans l'eau, produits et consommables utilisés, de contamination (ADN ou ARN), de nucléase, d'inhibiteur ou de tout autre élément pouvant interférer sur le résultat.

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



5.1 Eau

Eau du robinet

Eau ultra pure de qualité biologie moléculaire

5.2 Kits d'extraction d'ADN

L'ADN total des extraits de bois (après extraction des nématodes à partir des échantillons de bois par la méthode dite de Baermann ou Baermann modifiée) est extrait et purifié à l'aide d'un kit d'extraction d'ADN disponible dans le commerce : QIAamp® DNA mini kit (Qiagen®). Tout autre kit ou protocole d'extraction d'ADN peut être utilisé dès lors qu'il donne des résultats au moins équivalents à ceux obtenus avec le kit d'extraction d'ADN préconisé (1 nématode de *B. xylophilus* doit être détecté et la valeur du « Cycle threshold » (Ct) doit être inférieure à 25).

5.3 Oligonucléotides

Cible	Amorces et sondes	Séquence 5' → 3'
<i>B. xylophilus</i>	BSatF	TGACGGAGTGAATTGACAAGACA
	BSatR	AAGCTGAAACTTGCCATGCTAAA
	BSatS	FAM-ACACCATTTCGAAAGCTAATCGCCTGAGA-BHQ1
Plante/champignon	18S uni-F	GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAA
	18S uni-R	CCACCACCCATAGAATCAAGA
	18S uni-P	JOE-ACGGAAGGGCACCACCAGGAGT-BHQ1

5.4 Pré-mix commercial

Des mélanges réactionnels prêts à l'emploi commercialisés par plusieurs fournisseurs et contenant certains réactifs nécessaires à la réalisation de master mix de PCR en temps réel (tampon de polymérase, polymérase à ADN, dNTP, MgCl₂, etc.) peuvent être utilisés dès lors que les résultats obtenus sont au moins équivalents à ceux obtenus avec le kit utilisé lors de l'évaluation de la méthode (au minimum, vérifier la sensibilité et la spécificité).

Le protocole a été évalué en utilisant le pré-mix LightCycler® 480 Probes Master de la société Roche Diagnostics.

5.5 Contrôles

Des échantillons de référence doivent être inclus en cours de processus analytique pour valider les différentes étapes de la méthode. Les contrôles à produire au cours de l'analyse sont au minimum les suivants :



Un témoin positif de processus (E+)¹ : extrait de bois contaminé naturellement ou artificiellement avec quelques individus de *B. xylophilus* (si possible 2 individus), traité à partir de l'étape d'extraction d'ADN dans les mêmes conditions que les extraits de bois à analyser.

Un témoin négatif de processus (E-) : extrait de bois non contaminé en *B. xylophilus*, traité à partir de l'étape d'extraction d'ADN dans les mêmes conditions que les extraits de bois à analyser ; ce contrôle peut éventuellement contenir des nématodes autres que *B. xylophilus*.

Un témoin positif de PCR (A+)¹ : il contient tous les éléments du mélange réactionnel, ainsi qu'un extrait d'ADN de *B. xylophilus* ; ce témoin permet de vérifier que la réaction de PCR s'est déroulée de façon correcte et permet une amplification des échantillons contaminés.

Un témoin négatif de PCR (A-) : il contient tous les éléments du mélange réactionnel, l'extrait d'ADN est remplacé par le même volume d'eau; cela permet de vérifier l'absence de contamination au cours de la réaction de PCR.

Ces témoins permettent de vérifier le bon fonctionnement des étapes d'extraction d'ADN et de PCR (extraction et amplification de l'ADN de *B. xylophilus* pour le contrôle positif et l'absence de contamination pour le contrôle négatif).

5.6 Autres consommables à usage unique

- Filtre papier ou cellulose,
- tubes à fond conique (30 mL minimum),
- embouts de pipette avec et sans filtre de volume adapté,
- microtubes d'environ 2 mL,
- microtubes, capillaires ou plaques pour PCR adaptés au thermocycleur temps réel,
- billes de verre de 1 mm et 3 mm de diamètre.

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.

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

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

¹ Ce type de témoin peut être fourni par l'unité de nématologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux



erreurs maximales tolérées (EMT) à prendre en considération sont données dans le tableau ci-après (dans le cas contraire, des spécifications sont précisées dans le texte de la méthode).

Grandeur	EMT
Volume	volume < à 10mL : EMT = $\pm 10\%$
Température	réfrigérateur : 5°C et EMT = $\pm 4^\circ\text{C}$ (ou plus strict en fonction des recommandations fournisseur) congélateur : $\leq -10^\circ\text{C}$ ou $\leq -18^\circ\text{C}$ en fonction de l'usage 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 des thermocycleurs.*

En plus de l'appareillage courant d'un laboratoire de biologie moléculaire (pipettes, centrifugeuses, agitateur, bain-marie, ...), le matériel suivant est nécessaire pour certaines phases de l'analyse :

Cuvettes ou autres récipients de capacité adaptée

Tamis de migration ou autre support de mailles supérieures à 40 μm

Tamis de récupération (mailles d'environ 20 μm au plus)

Récipients pour conditionnement des extraits

Broyeur de tissu oscillant pour microtubes d'environ 2 mL (par exemple Tissuelyser, Qiagen®) ou matériel équivalent

Appareil de PCR en temps réel et ordinateur de pilotage avec un logiciel permettant l'acquisition de fluorescence.

7 Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse

La taille et le volume minimaux des échantillons à prélever pour la recherche de *B. xylophilus* sont définis dans les notes de service correspondantes. Ils doivent permettre une mise en migration optimale avec le matériel standard d'un laboratoire et limiter les risques de dissémination liés aux vecteurs.

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Dans le cadre du plan de surveillance, une incubation préalable est réalisée, notamment pour permettre une multiplication des nématodes éventuellement présents et augmenter la capacité de détection. Pour ce faire, les échantillons sont mis à incuber dans un sac en plastique fermé et si besoin légèrement humidifiés à l'aide d'un pulvérisateur à main (cas de bois très sec). Ils sont maintenus à une température d'environ 25 °C, à l'aide d'un incubateur par exemple, pendant une période minimale de 15 jours à partir de la date de réception (Schröder *et al*, 2009).



7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Pendant l'analyse, les reliquats d'échantillons sont à conserver dans les mêmes conditions qu'avant analyse (§7.2) et ce jusqu'à la fin de l'analyse.

Dans le cas où une analyse de confirmation est nécessaire, l'ADN extrait ainsi que le reliquat d'échantillon de bois sont adressés au laboratoire réalisant l'analyse de confirmation.

Dans le cas des échantillons négatifs, il n'y a pas d'exigences particulières concernant la conservation des reliquats de matériels utilisés sauf spécifications contraires de la Direction Générale de l'Alimentation au sein du ministère chargé de l'agriculture.

8 Mode opératoire

L'analyse est réalisée sur des copeaux, des morceaux de bois ou d'écorces de conifères.

Utiliser au maximum 400 mL de copeaux, d'écorces ou de morceaux de bois.

Le laboratoire doit mettre en place une procédure adaptée à son environnement (locaux, infrastructures,...) visant à éviter tout risque de confusion entre échantillons et de contamination d'un échantillon par un autre.

8.1 Extraction des nématodes à partir du bois

L'échantillon est traité selon la méthode de Baermann modifiée décrite ci-dessous (cf. chapitre 1.2.2.2 de la MOA012) :

1. Placer l'échantillon à extraire sur un tamis ou une passoire de maille supérieure ou égale à 40 µm, en intercalant un tissu type essuie tout ou filtre à lait entre l'échantillon et le tamis.
2. Le tout est placé dans une cuvette ou un contenant équivalent dans lequel on versera de l'eau du robinet jusqu'à recouvrir l'échantillon.
3. Laisser migrer les nématodes dans l'eau de la cuvette pendant au moins 24h. Après ce laps de temps, le tamis est retiré. L'eau de la cuvette est passée à travers un tamis de 20 µm afin de concentrer les nématodes présents dans la suspension.
4. Transférer le contenu du tamis de récupération dans un récipient à l'aide d'une pissette d'eau.

8.2 Conditionnement de l'extrait

1. L'extrait de bois obtenu est transféré dans un tube à fond conique d'au moins 30 mL.
2. Laisser décanter l'extrait au moins 3 heures à température ambiante.

Remarque : l'extrait peut être placé au froid positif pour une plus longue conservation mais sa conservation ne doit pas excéder 7 jours à cette étape.

3. Réaliser une prise d'essai par échantillon en prélevant environ 1,5 mL au fond du tube puis les placer dans un microtube.



4. Centrifuger à environ 15000 g pendant approximativement 10 minutes (durée et accélération approximatives).
5. Eliminer le surnageant et conserver le culot.

Remarque : à l'issue de cette étape, les tubes contenant le culot peuvent être stockés au congélateur (<-10 °C) avant de procéder à la suite de l'analyse.

Cas particulier : si l'ensemble des débris présents au fond du tube à fond conique n'a pas pu être prélevé lors de l'étape 3, poursuivre le conditionnement décrit dans les étapes 4 et 5 puis procéder à un nouveau prélèvement d'environ 1 mL au fond du tube à fond conique. Le déposer sur le premier culot (obtenu au cours de l'étape 5) dans le microtube correspondant au même échantillon. Réaliser à nouveau les étapes 4 et 5.

8.3 Extraction d'ADN

La présente méthode a été validée en utilisant le kit d'extraction d'ADN QIAamp® (Qiagen®). Le laboratoire peut choisir d'utiliser un autre kit, mais il doit apporter la preuve que les critères de performance de la méthode globale ainsi modifiée restent au moins équivalents à ceux de la méthode ci-dessous (1 nématode de *B. xylophilus* doit être détecté et la valeur du « Cycle threshold » (Ct) doit être inférieure à 25).

1. Ajouter des billes de verre dans chaque microtube (2 billes de 3 mm et quelques billes de 1 mm de diamètre).
2. Ajouter la solution de tampon de lyse fourni avec le kit d'extraction d'ADN. Le volume de tampon de lyse à ajouter est celui préconisé par le fournisseur du kit. Dans le cas du kit QIAamp® (Qiagen®), ajouter 180 µL de tampon de lyse (ATL) + 20 µL de protéinase K).
3. Remettre le culot en suspension par agitation.
4. Réaliser un broyage par agitation à environ 30 coups par seconde pendant environ 40 secondes.
5. Incuber les extraits au moins une heure à 56 °C dans un bain thermostaté.
6. Reprendre les microtubes et procéder à une brève centrifugation ; ajouter 200 µL de tampon AL et bien vortexer
7. Incuber environ 10 mn à 70°C
8. Reprendre les microtubes et procéder à une brève centrifugation; ajouter 200 µL d'éthanol (96 -100%) ; bien homogénéiser
9. Transférer le contenu du tube sur la colonne
10. Centrifuger 1 mn à 6000 g
11. Placer la colonne sur un collecteur propre et ajouter 500 µl de tampon AW1
12. Centrifuger 1 mn à 6000 g



13. Placer la colonne sur un collecteur propre et ajouter 500µl de tampon AW2
14. Centrifuger 3 mn à 20000 g
15. Placer la colonne sur un microtube propre et identifié de 1.5 mL et ajouter 100 µL de tampon AE ou d'eau distillée.
16. Incuber quelques minutes à température ambiante puis centrifuger 1 mn à 6000 g.

Les solutions d'ADN ainsi obtenues sont ensuite analysées directement par PCR temps réel ou congelées (< -10 °C) jusqu'à leur analyse.

8.4 Détection par PCR temps réel

Ce protocole a été évalué et validé en utilisant le pré-mix LightCycler® 480 Probes Master de la société Roche Diagnostics. Le laboratoire peut choisir d'utiliser un autre kit, mais il doit apporter la preuve que les critères de performance de la méthode globale ainsi modifiée restent au moins équivalents à ceux de la présente méthode.

1. Préparation du mélange réactionnel :
Chaque tube est analysé **en duplicat**. La composition du mélange réactionnel est la suivante :

Réactifs	Concentration finale (volume final par puits : 20 µL)
Eau Ultra Pure	qsp 15 µL
Tampon de polymérase à ADN ou tampon de pré-mix commercial	1 X*
Chlorure de magnésium	5,5 mM*
Amorce BSatF	0,3 µM
Amorce BSatR	0,3 µM
Sonde BSatS	0,1 µM
Amorce 18S uni-F	0,3 µM
Amorce 18S uni-S	0,3 µM
Sonde 18S uni-P	0,1 µM
dNTPs	200 µM / dNTP*
Taq polymérase	0,025U/µL*

* ou concentration fixée et optimisée par le fournisseur si un pré-mix du commerce est utilisé.

2. Distribution du mélange réactionnel à raison de 15 µL par puits PCR (plaques, microtubes ou autres consommables adaptés au thermocycleur).
3. Ajout de 5 µL de solution d'ADN à tester dans les puits PCR.



4. Amplification

Le programme d'amplification du thermocycleur est le suivant :

Dénaturation initiale	10 mn à 95°C	35 cycles
Dénaturation	15 s à 95°C	
Hybridation - Elongation	1 mn à 60°C*	

* acquisition de la fluorescence en fin d'élongation

9 Résultats

9.1 Validation et expression des résultats

Les résultats obtenus par PCR temps réel sont traités préférentiellement par une analyse automatique du logiciel ou à défaut en définissant et en appliquant toujours la même ligne de seuil. Une valeur de Ct doit être accompagnée d'une courbe de type exponentiel pour être prise en compte.

9.1.1 Validation de l'amplification

L'amplification est validée pour l'organisme cible recherché (test spécifique, BSat) lorsque :

- le témoin négatif de PCR (A-) ne donne pas d'amplification,
- le témoin positif de PCR (A+) donne une amplification avec une valeur de Ct < 25.

9.1.2 Validation de l'extraction d'ADN

L'extraction d'ADN est validée pour l'organisme cible recherché (test spécifique, BSat) lorsque :

- le témoin négatif de processus (E-) ne génère pas d'amplification ou montre une amplification avec une valeur de Ct \geq 25,
- le témoin positif de processus (E+) génère une amplification avec une valeur de Ct < 25.

Dans le cas où les résultats d'un ou plusieurs témoins ne sont pas conformes à ceux attendus (définis ci-dessus), l'analyse n'est pas validée et selon la non-conformité observée, toute ou partie de l'analyse est à refaire.

9.1.3 Interprétation des résultats

Lorsque la série d'analyses est validée par l'obtention de résultats conformes pour les différents témoins, les résultats des échantillons à analyser peuvent être interprétés de la façon suivante :



- **Interprétation des réactions en duplicat pour le test BSat**

Analyse		Résultat du test
Puits 1	Puits 2	
+	+	POSITIF
+	-	PCR à refaire. Si au moins 1 positif sur 2 lors de la 2 ^{ème} amplification, le résultat est interprété comme positif.
-	-	NEGATIF

+ : observation d'une courbe d'amplification exponentielle avec une valeur de Ct < 25 pour le test spécifique *B. xylophilus*

- : absence de courbe d'amplification exponentielle ou observation d'une courbe d'amplification exponentielle avec une valeur de Ct ≥ 25 pour le test spécifique *B. xylophilus*

- **Interprétation des réactions en duplicat pour le test 18S uni**

Analyse		Résultat du test
Puits 1	Puits 2	
+	+	POSITIF
+	-	POSITIF
-	-	NEGATIF

+ : observation d'une courbe d'amplification exponentielle avec une valeur de Ct < 30 pour le test 18S uni

- : absence de courbe d'amplification exponentielle ou observation d'une courbe d'amplification exponentielle avec une valeur de Ct ≥ 30 pour le test 18S uni

- **Interprétation du résultat final pour l'échantillon (x) : formulation type du résultat décrit au paragraphe 9.1.4).**

Amplification BSat	Amplification 18S _{Uni}	
	Positif (Ct 18S _{UNI} < 30)	Négatif (Ct 18S _{UNI} ≥ 30) ou absence d'amplification
Positif (Ct BSat < 25)	Positif (1)	
Négatif (Ct BSat ≥ 25* ou absence d'amplification)	Négatif (2)	Refaire la PCR avec la solution d'ADN diluée au 1/10 ^e : a) si Ct 18S _{UNI} < 30, Négatif (2) b) si le résultat de la 2 ^{ème} PCR est identique à celui de la 1 ^{ère} PCR, le résultat n'est pas interprétable. Le reliquat d'échantillon (et/ou échantillon doublon selon les dispositions officielles) est transmis au LNR pour analyse. Non interprétable (3)



**Remarque : dans le cas où une courbe d'amplification exponentielle est observée et $25 \leq Ct < 30$ pour le test spécifique, le résultat de la prise d'essai considérée est négatif. Toutefois, une analyse sera réalisée par le LNR.*

9.1.4 Formulation du résultat d'analyse

Le résultat final de l'analyse selon le cas 1, 2 ou 3 est exprimé sous forme qualitative du type : « Détection de *B. xylophilus* par PCR temps réel » :

- « Test positif » lorsque le résultat de la prise d'essai est positif pour l'organisme cible (1).
- « Test négatif » lorsque le résultat de la prise d'essai est négatif pour l'organisme cible (2),
- « Test non interprétable », lorsque les résultats sont négatifs pour l'organisme cible et pour le test 18Suni (ADN concentré et dilué au $1/10^6$), (3).

Pour tous résultats d'analyse positifs et dans le cas de résultats non-interprétables, il sera fait mention sur le rapport d'analyse que ce résultat doit être complété par une analyse réalisée par le LNR.

10 Caractéristiques de performance de la méthode

La synthèse des caractéristiques de performance de la méthode présentée dans le tableau ci-après est extraite du rapport de validation de méthode d'analyse établi par le LNR (version 2 septembre 2014).

Critères	Résultats
Seuil de détection	1 individu
Répétabilité du test PCR au seuil de détection	100%
Reproductibilité du test PCR au seuil de détection	100%
Répétabilité de la méthode de détection au seuil de détection	100%
Reproductibilité de la méthode de détection au seuil de détection	100%
Spécificité relative	100%
Sensibilité relative	100%
Exactitude relative	100%
Facilité d'interprétation des résultats	+
Facilité de mise en œuvre au sein d'autres laboratoires	+

La spécificité de la méthode a été évaluée sur un panel de 7 populations cibles d'origines géographiques variées (inclusivité) et 15 populations non cibles mais proches de la cible ou susceptibles d'être présentes dans les échantillons.

Liste des espèces et populations utilisées :

Code interne des populations	Espèces	Origine
09 373 -1	<i>B. xylophilus</i>	Canada
J10 08 1063 -1	<i>B. xylophilus</i>	Asie
08 104 -1	<i>B. xylophilus</i>	Chine
09 375 -1	<i>B. xylophilus</i>	Portugal
08 746 -1	<i>B. xylophilus</i>	Chine
08 747 -1	<i>B. xylophilus</i>	Japon
09 374 -1	<i>B. xylophilus</i>	Canada
04 421 -1	<i>B. mucronatus</i>	France, région centre
05 948 -1	<i>B. mucronatus</i>	France, région aquitaine
04 1245 -1	<i>B. mucronatus</i>	France, herault
J13 09 376 -1	<i>B. mucronatus</i>	Type asiatique
08 767 -1	<i>B. mucronatus</i>	Chine
08 770 -1	<i>B. mucronatus</i>	Japon
06 1284 -1	<i>B. sexdentati</i>	France, Hérault
06 1285 -1	<i>B. sexdentati</i>	France, Hérault
07 1052 -1	<i>B. sp</i>	France, PACA
06 1280 -1	<i>B. sp</i>	France, Hérault
06 1674 -1	<i>B. sp</i>	Chine
09 85 -1	<i>B. doui</i>	
09 89 -1	<i>B. fraudulentus</i>	
09 90 -1	<i>B. singaporensis</i>	
09 91 -1	<i>B. macromucronatus</i>	

La caractérisation de la présente méthode a été réalisée par comparaison avec des tests PCR différents pouvant être considérés comme des méthodes alternatives. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec la combinaison « kit QIAamp® DNA Blood mini (Qiagen®)/ primers développés par François *et al.*, 2007 et le kit d'amplification LightCycler® 480 Probes Master (Roche Diagnostics). Cette combinaison permet de détecter comme positif 100% des extraits de bois contenant un nématode de l'espèce *Bursaphelenchus xylophilus*.



Bibliographie

BAERMANN G. (1917) Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (nematoden) Larven in Erdproben. *Geneesk. Tijdschrift Ned-indie* 57, 131-137.

FRANCOIS C., CASTAGNONE C., BOONHAM N., TOMLINSON J., LAWSON R., HOCKLAND S., QUILL J., VIEIRA P., MOTA M., CASTAGNONE-SERENO P. (2007) Satellite DNA as a target for TaqMan real-time PCR detection of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Molecular plant pathology* 8(6), 803-809.

IOOS R., FOURRIER C., IANCU G, GORDON TR. (2009) Sensitive detection of *Fusarium circinatum* in pine seed by combining an enrichment procedure with a real-time polymerase chain reaction using dual-labeled probe chemistry. *Phytopathology* 99, 582-590.

SCHRÖDER, T., McNAMARA, D. G. and GAAR, V. (2009), Guidance on sampling to detect pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* in trees, wood and insects. EPPO Bulletin, 39: 179–188. doi: 10.1111/j.1365-2338.2009.02287.x