

MEMORIAL
Journal Officiel
du Grand-Duché de
Luxembourg



MEMORIAL
Amtsblatt
des Großherzogtums
Luxemburg

RECUEIL DE LEGISLATION

A — N° 156

22 août 2007

S o m m a i r e

**LUTTE CONTRE LE FLETRISSEMENT BACTERIEN
DE LA POMME DE TERRE**

Règlement grand-ducal du 1^{er} août 2007 modifiant le règlement grand-ducal du 17 décembre 1994 concernant la lutte contre le flétrissement bactérien de la pomme de terre. page **2844**

Règlement grand-ducal du 1^{er} août 2007 modifiant le règlement grand-ducal du 17 décembre 1994 concernant la lutte contre le flétrissement bactérien de la pomme de terre.

Nous Henri, Grand-Duc de Luxembourg, Duc de Nassau,

Vu la loi du 14 juillet 1971 concernant la protection des végétaux et produits végétaux contre les organismes nuisibles;

Vu la directive 93/85/CEE du Conseil concernant la lutte contre le flétrissement bactérien de la pomme de terre, telle que modifiée en dernier lieu par la directive 2006/56/CE de la Commission du 12 juin 2006;

Vu l'avis de la Chambre d'Agriculture;

Vu l'avis de la Chambre de Commerce;

Vu l'article 2 (1) de la loi du 12 juillet 1996 portant réforme du Conseil d'Etat et considérant qu'il y a urgence;

Sur le rapport de Notre Ministre de l'Agriculture, de la Viticulture et du Développement rural et après délibération du Gouvernement en Conseil;

Arrêtons:

Art. 1^{er}. Les annexes I à III du règlement grand-ducal du 17 décembre 1994 concernant la lutte contre le flétrissement bactérien de la pomme de terre sont remplacées comme indiqué à l'annexe du présent règlement.

Art. 2. L'annexe fait partie intégrante du présent règlement grand-ducal.

Art. 3. Notre Ministre de l'Agriculture, de la Viticulture et du Développement rural est chargé de l'exécution du présent règlement qui sera publié au Mémorial.

Le Ministre de l'Agriculture,
de la Viticulture
et du Développement rural,
Fernand Boden

Cabasson, le 1^{er} août 2007.
Henri

Dir. 2006/56/CE

ANNEXE I

**PROTOCOLE DE TEST EN VUE DU DIAGNOSTIC, DE LA DETECTION ET DE
L'IDENTIFICATION DE L'AGENT RESPONSABLE DU FLETRISSEMENT
BACTERIEN DE LA POMME DE TERRE, *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS*
(Smith) Davis et al. ssp. *SEPEDONICUS* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al.**

CHAMP D'APPLICATION DU PROTOCOLE DE TEST

Le protocole présenté ci-dessous décrit les différentes étapes à suivre pour:

- i) le diagnostic du flétrissement bactérien sur les tubercules et sur les plants de pomme de terre;
- ii) la détection de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* sur des échantillons de tubercules et de plants de pomme de terre;
- iii) l'identification de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*C. m.* ssp. *sepedonicus*).

TABLE DES MATIERES

Principes généraux

1. Diagramme fonctionnel

- 1.1 Protocole de détection en vue du diagnostic du flétrissement bactérien sur des tubercules et des plants de pomme de terre présentant des symptômes de la maladie
- 1.2 Protocole de détection et d'identification de *C. m.* ssp. *sepedonicus* sur des échantillons de tubercules de pomme de terre asymptomatiques
- 1.3 Protocole de détection et d'identification de *C. m.* ssp. *sepedonicus* sur des échantillons de plants de pomme de terre asymptomatiques

2. Recherche visuelle des symptômes du flétrissement bactérien

- 2.1 Plants de pomme de terre
- 2.2 Tubercules de pomme de terre

3. Préparation de l'échantillon

- 3.1 Tubercules de pomme de terre
- 3.2 Plants de pomme de terre

4. Test d'immunofluorescence (test IF)

5. Test d'hybridation fluorescente in situ (test FISH)

6. Test de réaction en chaîne par polymérase (test RCP)

6.1 Méthodes de purification de l'ADN

6.1. a) Méthode de Pastrik (2000)

6.1. b) Autres méthodes

6.2 PCR

7. Test biologique

8. Isolement de *C. m. ssp. sepedonicus*

8.1 Etalement sur milieu sélectif

8.2 Purification des colonies présumées de *C. m. subsp. sepedonicus*

9. Identification

9.1 Tests d'identification nutritionnels et enzymatiques

9.2 Test d'immunofluorescence

9.3 Test PCR

9.4 Test FISH

9.5 Test de profil des acides gras (FAP)

9.6 BOX-PCR

10. Test de confirmation

Appendice 1 Laboratoires pratiquant l'optimisation et la validation des protocoles

Appendice 2 Préparation des témoins

Appendice 3 Tampons pour les procédures de test

Appendice 4 Détermination du degré de contamination lors des tests IF et FISH

Appendice 5 Milieux d'isolement et de culture de *C. m. ssp. sepedonicus*

Appendice 6 Protocole et réactifs PCR validés

Appendice 7 Réactifs validés pour le test FISH

Appendice 8 Cultures d'aubergine

Appendice 9 Coloration de Gram

Références

PRINCIPES GENERAUX

Les protocoles optimisés pour les différentes méthodes, les réactifs validés et les modalités de la préparation du matériel nécessaire aux tests et aux contrôles figurent dans les appendices. Une liste des laboratoires retenus pour l'optimisation et la validation des protocoles est fournie à l'appendice 1.

Etant donné que les protocoles impliquent la détection d'un organisme nuisible à mettre en quarantaine et incluent l'utilisation de cultures viables de *C. m. ssp. sepedonicus* en tant que matériels de contrôle, il est nécessaire de mettre en œuvre les procédures dans des conditions de quarantaine appropriées, au moyen des installations adéquates d'élimination des déchets et dans le respect des exigences liées aux licences appropriées délivrées par les autorités officielles de quarantaine.

Les paramètres des tests doivent garantir une détection cohérente et reproductible des taux de *C. m. ssp. sepedonicus* aux seuils fixés pour les méthodes sélectionnées.

La préparation précise de témoins positifs est impérative.

La réalisation des tests selon les seuils requis implique également l'établissement de paramètres corrects, la maintenance et le calibrage des équipements, la manipulation et la conservation soigneuse des réactifs et toutes les mesures visant à empêcher la contamination entre échantillons, comme la séparation des témoins positifs et des échantillons des tests. Des normes de contrôle de la qualité doivent être appliquées pour éviter toute erreur, notamment d'ordre administratif, dans l'étiquetage et la documentation.

L'apparition suspectée d'un foyer, au sens de l'article 4, paragraphe 2, de la directive 93/85/CEE, implique une réaction positive aux tests de diagnostic ou de dépistage réalisés sur un échantillon, comme cela est indiqué dans les diagrammes.

Si le premier test de dépistage (IF ou PCR/FISH) est positif, il y a suspicion de contamination par le Cms et un second test de dépistage doit être effectué. Si le second test de dépistage est positif, la suspicion est confirmée (apparition suspectée) et il y a lieu de poursuivre les tests conformément au protocole. Si le second test de dépistage est négatif, l'échantillon est considéré comme non contaminé par le Cms.

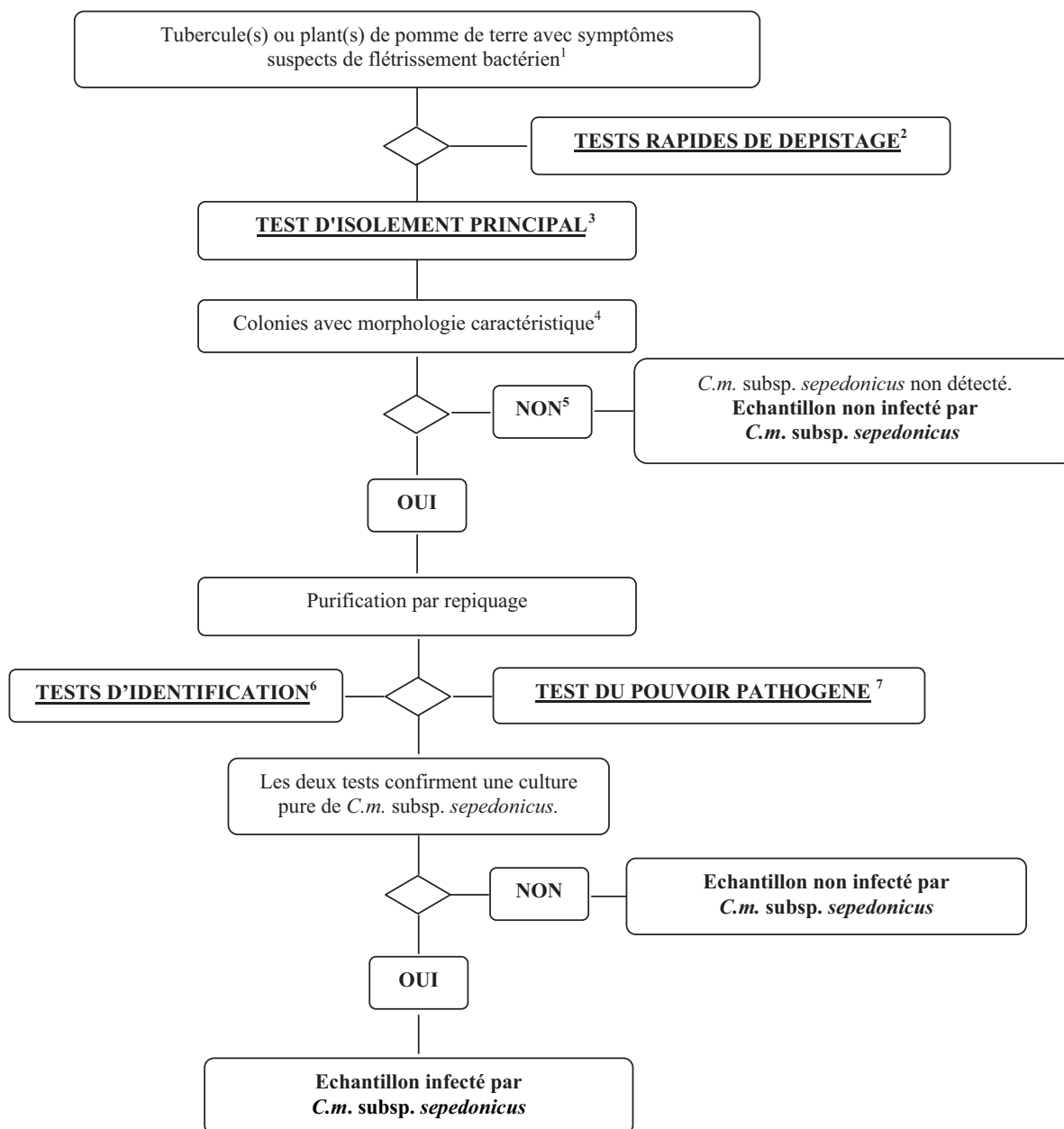
La réaction positive au test d'immunofluorescence visée à l'article 4, paragraphe 2, est donc définie comme une réaction positive au test d'immunofluorescence confirmée par un second test de dépistage (PCR/FISH).

La présence confirmée visée à l'article 5, paragraphe 1, de la directive 93/85/CEE implique l'isolement et l'identification d'une culture pure de *C. m. ssp. sepedonicus* avec confirmation de la pathogénicité.

1. PRESENTATION DU DIAGRAMME FONCTIONNEL

1.1 PROTOCOLE DE DETECTION EN VUE DU DIAGNOSTIC DU FLETRISSEMENT BACTERIEN SUR DES TUBERCULES ET DES PLANTS DE POMME DE TERRE PRESENTANT DES SYMPTOMES DE LA MALADIE

La procédure de test concerne les tubercules de pomme de terre et les plants présentant des symptômes caractéristiques du flétrissement bactérien ou permettant d'en suspecter la présence. Elle comporte un test rapide de dépistage, l'isolement de l'organisme pathogène à partir du tissu vasculaire infecté sur des milieux de diagnostic et, en cas de résultat positif, l'identification de la culture comme étant *C. m. ssp. sepedonicus*.



¹ La description des symptômes figure à la section 2.

² Les tests appropriés sont:
le test d'immunofluorescence (section 4),
le test PCR (section 6),
le test FISH (section 5).

³ Bien que l'isolement par dilution et étalement sur milieu de culture de l'agent pathogène provenant de matériel végétal présentant des symptômes caractéristiques soit une tâche simple, la mise en culture risque d'échouer à partir des stades d'infection avancés. Les bactéries saprophytes qui se développent sur un tissu malade risquent en effet de se multiplier beaucoup plus rapidement que l'agent pathogène ou d'inhiber sa croissance sur le milieu d'isolement. Il est donc recommandé d'utiliser à la fois des milieux non sélectifs et sélectifs, de préférence du type MTNA (section 8), ou de recourir au test biologique (section 7).

⁴ Le profil morphologique d'une colonie caractéristique est présenté à la section 8.

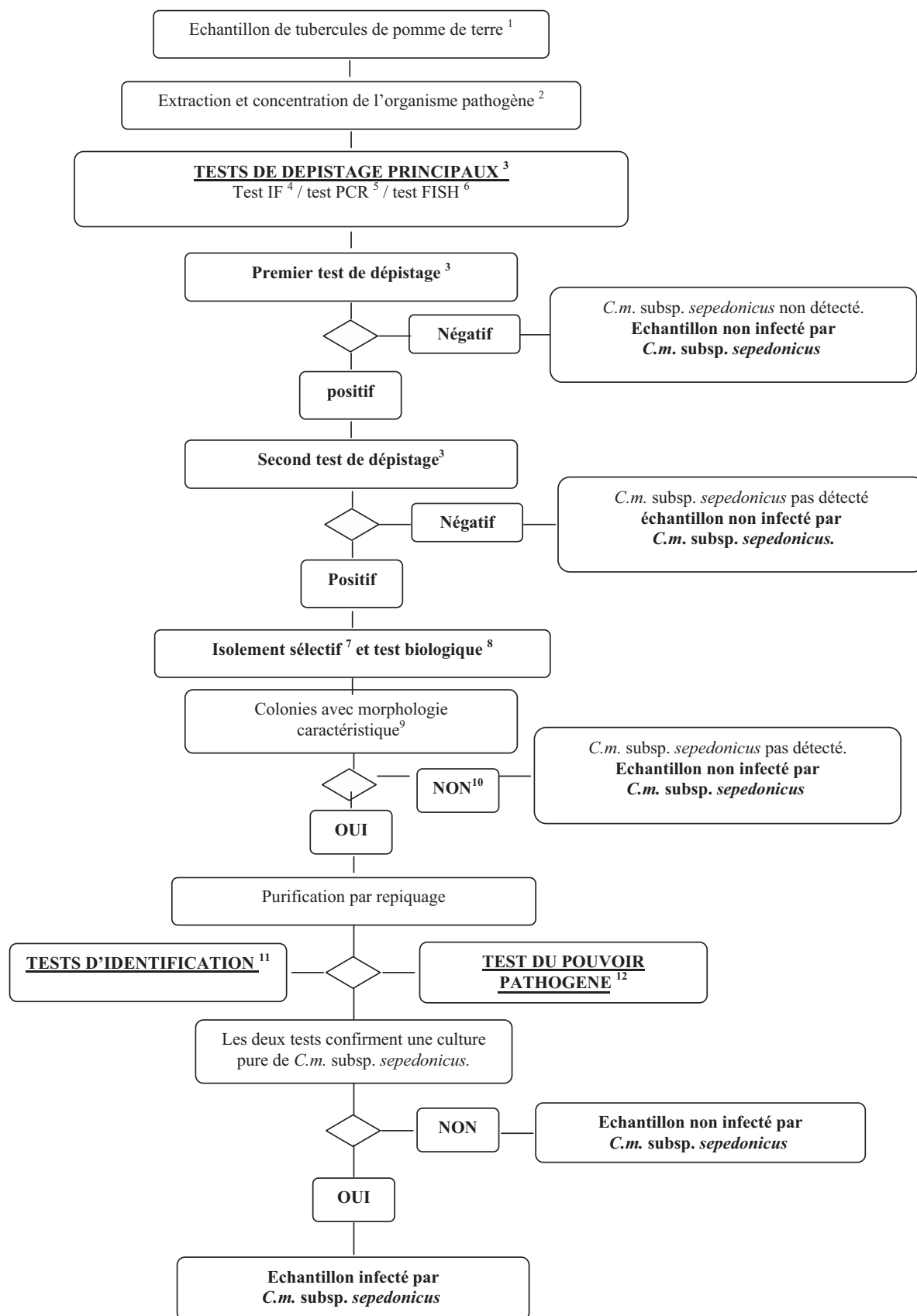
- ⁵ Lorsque le test d'isolement est négatif en dépit de symptômes caractéristiques de la maladie, l'isolement doit être réitéré.
- ⁶ Il est possible d'identifier de manière fiable une culture pure de *C. m. ssp. sepedonicus* en utilisant les tests énumérés à la section 9.
- ⁷ Le test du pouvoir pathogène est décrit à la section 10.

1.2 PROTOCOLE DE DETECTION ET D'IDENTIFICATION DE *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SSP. *SEPEDONICUS* SUR DES ECHANTILLONS DE TUBERCULES DE POMMES DE TERRE ASYMPTOMATIQUES

Principe

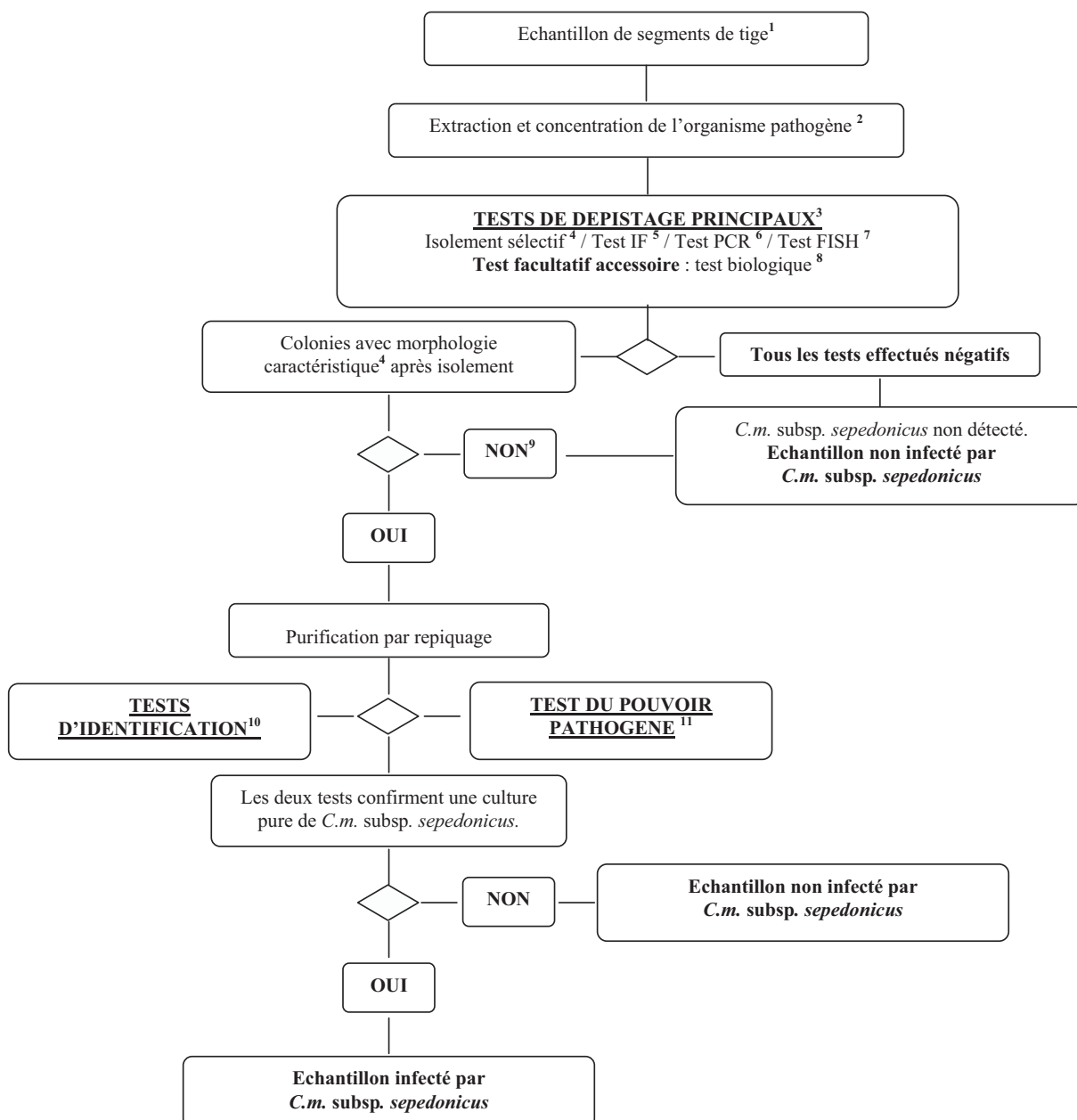
La procédure de test vise à détecter des infections latentes de tubercules de pomme de terre. Tout résultat positif d'au moins deux tests de dépistage³, fondés sur des principes biologiques différents, doit être complété par l'isolement de l'organisme pathogène, suivi, en cas d'isolement de colonies caractéristiques, de la confirmation d'une culture pure comme étant *C. m. ssp. sepedonicus*. Le résultat positif d'un unique test de dépistage n'est pas suffisant pour que l'échantillon soit considéré comme suspect.

Les tests de dépistage et les tests d'isolement doivent autoriser des seuils de détection compris entre 10^3 et 10^4 cellules/ml d'extrait concentré remis en suspension, inclus à titre de témoins positifs dans chaque série de tests.



- ¹ La taille de l'échantillon standard est de 200 tubercules, bien que la procédure puisse être appliquée à des échantillons plus réduits si l'on ne dispose pas de 200 tubercules.
- ² L'extraction de l'organisme pathogène et les méthodes de concentration sont décrites à la section 3.1.
- ³ Si au moins deux tests fondés sur des principes biologiques différents se révèlent positifs, l'isolement et la confirmation doivent être effectués. Réaliser au moins un test de dépistage. Si ce test est négatif, l'échantillon est considéré comme négatif. S'il est positif, il y a lieu de procéder à, au moins, un deuxième test de dépistage fondé sur des principes biologiques différents afin de vérifier le premier résultat positif. Si le deuxième test ou les suivants sont négatifs, l'échantillon est considéré comme négatif. Il n'est alors pas nécessaire de procéder à d'autres tests.
- ⁴ Test d'immunofluorescence (IF).
Toujours utiliser un anticorps polyclonal pour les tests d'immunofluorescence. On peut obtenir plus de spécificité (voir section 4) en y associant des anticorps monoclonaux supplémentaires.
- ⁵ Test PCR.
Utiliser des réactifs et des protocoles PCR dûment validés (voir section 6).
- ⁶ Test FISH.
Utiliser des réactifs et des protocoles validés (voir section 5).
- ⁷ Isolement sélectif.
Associé à l'emploi d'un milieu MTNA ou NCP-88 et d'une dilution au 1/100^e d'extrait concentré remis en suspension, l'isolement sélectif constitue dans de nombreux cas une bonne méthode d'isolement direct de *C. m. ssp. sepedonicus*. L'obtention de colonies caractéristiques peut intervenir entre trois et dix jours après l'étalement. Il est alors possible de procéder à la purification et à l'identification de l'agent pathogène. Pour mettre pleinement à profit les possibilités offertes par ce test, il faut préparer soigneusement les cônes de pommes de terre prélevés au talon afin d'éviter la contamination par les bactéries secondaires liées au tubercule, qui constituent des organismes concurrents de *C. m. ssp. sepedonicus* sur le milieu de culture et sont susceptibles de supplanter cet agent pathogène. En cas d'échec du test d'étalement, l'isolement doit être effectué à partir des plants utilisés pour le test biologique (voir section 8).
- ⁸ Le test biologique est utilisé pour l'isolement de *C. m. ssp. sepedonicus* à partir d'extraits de pommes de terre par enrichissement sélectif dans des aubergines (*Solanum melongena*). Il exige des conditions optimales d'incubation conformes aux spécifications de cette procédure. Les bactéries ayant un effet inhibiteur sur *C. m. ssp. sepedonicus* en présence d'un milieu MTNA ou NCP-88 ne risquent guère de gêner le déroulement de ce test (voir section).
- ⁹ Le profil morphologique d'une colonie caractéristique est présenté à la section 8.
- ¹⁰ La mise en culture ou les tests biologiques risquent d'échouer en raison de la concurrence ou de l'effet inhibiteur de bactéries saprophytes. Si les tests de dépistage produisent des résultats positifs mais que les tests d'isolement sont négatifs, il convient de réitérer les tests d'isolement sur le même extrait ou à l'aide de nouveaux prélèvements de tissu vasculaire effectués à proximité du talon sur des tubercules coupés provenant du même échantillon et, au besoin, de tester des échantillons supplémentaires.
- ¹¹ Il est possible d'identifier de manière fiable des cultures pures d'isolats supposés de *C. m. ssp. sepedonicus* en utilisant les tests énumérés à la section 9.
- ¹² Le test du pouvoir pathogène est décrit à la section 10.

1.3 PROTOCOLE DE DETECTION ET D'IDENTIFICATION DE *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SSP. *SEPEDONICUS* SUR DES ECHANTILLONS DE PLANTS DE POMMES DE TERRE ASYMPTOMATIQUES



¹ Voir section 3.2. pour la taille d'échantillons recommandée.

² L'extraction de l'organisme pathogène et les méthodes de concentration sont décrites à la section 3,2.

³ Si au moins deux tests fondés sur de principes biologiques différents se révèlent positifs, l'isolement et la confirmation doivent être effectués.

Réaliser au moins un test de dépistage. Si ce test est négatif, l'échantillon est considéré comme négatif. S'il est positif, il y a lieu de procéder à, au moins, un deuxième test de dépistage fondé sur des principes biologiques différents afin de vérifier le premier résultat positif. Si le deuxième test ou les suivants sont négatifs, l'échantillon est considéré comme négatif. Il n'est alors pas nécessaire de procéder à d'autres tests.

⁴ Le test d'isolement sélectif et le profil morphologique d'une colonie caractéristique sont présentés à la section 8.

⁵ Le test IF est décrit à la section 4.

⁶ Les tests PCR sont décrits à la section 6.

⁷ Le test FISH est décrit à la section 5.

⁸ Le test biologique est décrit à la section 7.

⁹ La mise en culture ou les tests biologiques risquent d'échouer en raison de la concurrence ou de l'effet inhibiteur de bactéries saprophytes. Si les tests de dépistage produisent des résultats positifs mais que les tests d'isolement sont négatifs, il convient de réitérer les tests d'isolement et, au besoin, de tester des échantillons supplémentaires.

¹⁰ Il est possible d'identifier de manière fiable des cultures pures d'isolats supposés de *C. m. ssp. sepedonicus* en utilisant les tests énumérés à la section 9.

¹¹ Le test du pouvoir pathogène est décrit à la section 10.

2. RECHERCHE VISUELLE DES SYMPTOMES DU FLÉTRISSEMENT BACTÉRIEN

2.1 PLANTS DE POMME DE TERRE

Dans le contexte climatique européen, il est rare d'observer les symptômes dans les champs, et lorsque c'est le cas, ce n'est possible qu'en fin de saison. En outre, il arrive fréquemment que les symptômes soient masqués par ceux d'autres maladies, par des dommages mécaniques ou par la sénescence, ou soient confondus avec eux. Les symptômes peuvent donc facilement passer inaperçus lors d'inspections sur place. Les symptômes du flétrissement sont très différents de ceux qui caractérisent le flétrissement bactérien. D'une manière générale, le premier progresse en effet lentement et se limite initialement au bord des feuilles. Les jeunes feuilles infectées continuent souvent à se développer, mais de façon moins marquée aux endroits infectés, ce qui donne aux feuilles des formes irrégulières. Les feuilles touchées par l'obstruction des tissus vasculaires situés plus bas sur la tige développent fréquemment des tâches chlorotiques intercostales de couleur jaune ou orange. Il arrive que les folioles, les feuilles et même les tiges infectées finissent par mourir. Souvent, les feuilles et les tubercules sont simplement rabougris. Il arrive occasionnellement de constater une atrophie des plants. Des illustrations en couleurs d'une série de symptômes sont présentées à l'adresse: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

2.2 TUBERCULES DE POMME DE TERRE

Les premiers symptômes sont, surtout près du talon, un aspect légèrement vitreux ou translucide du tissu, sans ramollissement autour du système vasculaire. L'anneau vasculaire peut présenter, au talon, une couleur légèrement plus foncée que la normale. Les premiers symptômes aisément identifiables sont une coloration jaunâtre de l'anneau vasculaire et le fait que, lorsqu'on presse doucement le tubercule, des colonnes de matière ressemblant à du fromage sortent des vaisseaux. Cet exsudat contient des millions de bactéries. Un brunissement du tissu vasculaire peut apparaître. A ce stade, le bulbe présente des symptômes semblables à ceux du flétrissement bactérien à *Ralstonia solanacearum*. Dans un premier temps, ces symptômes peuvent se limiter à une partie de l'anneau, qui n'est pas nécessairement proche du talon, avant de se propager graduellement à l'ensemble de l'anneau. Au fur et à mesure de la progression de l'infection, les tissus vasculaires sont détruits et le cortex extérieur peut se séparer du cortex intérieur. Aux stades avancés de l'infection, des fissures, aux bords souvent rouge-brun, apparaissent à la surface du tubercule. Dans plusieurs cas observés récemment en Europe, on constate un pourrissement simultané du cortex central et de l'anneau vasculaire entraînant une infestation secondaire avec creusement interne et nécrose. Une infestation fongique ou bactérienne secondaire peut masquer les symptômes et il peut être malaisé, voire impossible, de distinguer les symptômes avancés du flétrissement bactérien de ceux d'autres pourritures des tubercules. Des formes asymptomatiques ne sont pas à exclure. Des illustrations en couleurs d'une série de symptômes sont présentées à l'adresse: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

3. PREPARATION DE L'ÉCHANTILLON

3.1 TUBERCULES DE POMME DE TERRE

Nota bene:

- La taille de l'échantillon standard est de 200 tubercules par test. Un échantillonnage plus intensif implique davantage de tests sur des échantillons de cette taille. Un nombre plus important de tubercules dans l'échantillon entraînera une inhibition ou une interprétation difficile des résultats. Lorsqu'on ne dispose pas d'un tel nombre de tubercules, la procédure peut cependant être appliquée sans difficulté à des échantillons de moins de 200 tubercules.
- La validation de toutes les méthodes de détection décrites ci-après est basée sur la réalisation de tests sur des échantillons de 200 tubercules.
- L'extrait de pomme de terre décrit ci-dessous peut également être utilisé pour détecter la présence de la bactérie responsable du flétrissement bactérien de la pomme de terre, *Ralstonia solanacearum*.

Prétraitement facultatif préalable à la préparation de l'échantillon:

Laver les tubercules en appliquant des désinfectants (composés chlorés lorsque le test PCR doit être utilisé pour éliminer l'ADN pathogène) et des détergents appropriés entre les échantillons. Sécher les tubercules à l'air. Cette procédure de lavage est particulièrement utile (sans être obligatoire) pour les échantillons comportant des éléments de sol en excédent et si un test PCR ou une procédure d'isolement direct doit être mis en œuvre.

- 3.1.1 A l'aide d'un scalpel ou d'un couteau à légumes propre et désinfecté, peler chaque tubercule au niveau du talon de manière à faire apparaître le tissu vasculaire. Découper soigneusement un petit cône de tissu vasculaire au niveau du talon, en veillant à prélever aussi peu que possible de tissu non vasculaire (voir le site web accessible à l'adresse: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Nota bene: le cas échéant, mettre de côté les tubercules qui présentent des symptômes suspects de flétrissement bactérien et les tester séparément.

Si des symptômes suspects de flétrissement bactérien sont observés lors du prélèvement du cône de talon, il convient de procéder à une inspection visuelle du tubercule après l'avoir coupé à proximité du talon. Tout tubercule coupé présentant des symptômes suspects doit être subérimé pendant deux jours à température ambiante, puis conservé en quarantaine (à une température

comprise entre 4 et 10 °C) jusqu'à ce que tous les tests aient été achevés. Tous les tubercules de l'échantillon (y compris ceux qui présentent des symptômes suspects) doivent être conservés comme prescrit à l'annexe II.

- 3.1.2 Rassembler les cônes de talons dans des récipients jetables neufs qui peuvent être fermés et/ou scellés (dans le cas de récipients réutilisés, les nettoyer et les désinfecter intégralement à l'aide de composés chlorés). Il est préférable de traiter immédiatement les cônes de talons. A défaut, il convient de les entreposer dans le récipient, sans addition de tampon, et, soit de les réfrigérer pour une période inférieure à 72 heures, soit de les conserver à température ambiante pour une période inférieure à 24 heures. Le séchage et la subérisation ainsi que le développement de saprophytes lors de l'entreposage des cônes sont susceptibles de gêner la détection de l'agent responsable du flétrissement bactérien.

- 3.1.3 Traiter les cônes de talons en suivant l'une des procédures ci-dessous:

- a) recouvrir les talons d'un bain de tampon d'extraction en volume suffisant (environ 40 ml) (voir l'appendice 3) et les placer dans un agitateur rotatif (entre 50 et 100 tours/minute) pendant 4 heures à une température inférieure à 24 °C ou pendant 16 à 24 heures s'ils sont réfrigérés, ou
- b) homogénéiser les talons à l'aide d'un volume suffisant (environ 40 ml) de tampon d'extraction (voir l'appendice 3), soit dans un mixeur (par exemple Waring ou Ultra Thurax), soit en les broyant avec un maillet en caoutchouc ou un dispositif de broyage approprié (par exemple Homex) dans un sac de macération jetable scellé (par exemple de type Stomacher ou «Bioreba strong guage polythène» de 150 mm × 250 mm, stérilisé par radiations ionisantes).

Nota bene: il existe un risque élevé de contaminations croisées d'échantillons lorsque les échantillons sont homogénéisés au moyen d'un mixeur. Prendre des précautions pour éviter toute vaporisation ou débordement au cours du processus d'extraction. Veiller à utiliser des lames de mixeur et des vaisseaux fraîchement stérilisés pour chaque échantillon. En cas d'utilisation du test PCR, éviter tout transport d'ADN sur les récipients ou le dispositif de broyage. Le broyage dans des sacs jetables et l'utilisation de tubes jetables est recommandé en cas de recours au test PCR.

- 3.1.4 Décanter le liquide surnageant. S'il est excessivement trouble, le clarifier par une centrifugation à vitesse ralentie (à 180 g au maximum pendant 10 minutes, à une température de 4 à 10 °C ou par une filtration sous vide (40 à 100 µm), en lavant le filtre avec un tampon d'extraction supplémentaire (~ 10 ml) [voir l'appendice 3].

- 3.1.5 Concentrer la fraction bactérienne par centrifugation à une vitesse de 7 000 g pendant 15 minutes (ou de 10 000 g pendant 10 minutes), à une température comprise entre 4 et 10 °C, puis éliminer le liquide surnageant sans agiter le culot.

- 3.1.6 Remettre le culot en suspension dans un tampon de 1,5 ml (voir l'appendice 3). Utiliser 500 µl pour les tests relatifs à *C. m. ssp. sepedonicus*, 500 µl pour les tests relatifs à *Ralstonia solanacearum* et 500 µl à des fins de référence. Ajouter du glycérol stérile à la concentration finale de 10 à 25 % (en volume) aux 500 µl de l'aliquote de référence et à l'aliquote de test restante, passer au vortex et stocker à une température de -16 à -24 °C (semaines) ou de -68 à -86 °C (mois). Maintenir les aliquotes de test à une température de 4 à 10 °C pendant les tests.

Congélations et dégels répétés ne sont pas recommandés.

Si l'extrait doit être transporté, veiller à ce qu'il soit livré sous 24 à 48 heures dans une glacière.

- 3.1.7 Afin d'éviter toute contamination, il est impératif que tous les témoins positifs et échantillons de *C. m. ssp. sepedonicus* soient traités séparément, aussi bien pour les tests d'immunofluorescence que pour tous les autres tests.

3.2 PLANTS DE POMME DE TERRE

Nota bene: pour la recherche de populations latentes de C. m. ssp. sepedonicus, il est conseillé de tester des échantillons composites. La procédure peut facilement être appliquée à des échantillons composites comportant jusqu'à 200 parties de tiges. (Lorsque des enquêtes sont réalisées, elles doivent être basées sur un échantillon statistiquement représentatif de la population végétale considérée.)

- 3.2.1 A l'aide d'un couteau ou d'un sécateur propre et désinfecté, détacher un segment d'un à deux centimètres au niveau de la base de chaque tige, juste au-dessus du niveau du sol.

Après les avoir brièvement désinfectés au moyen d'éthanol à 70 %, sécher immédiatement les segments de tige au papier absorbant.

Rassembler les segments de tiges dans un récipient stérile fermé en observant les procédures d'échantillonnage exposées ci-après.

- 3.2.2 Traiter les segments de tiges en suivant l'une des procédures suivantes:

- a) recouvrir les segments de tiges d'un bain de tampon d'extraction en volume suffisant (environ 40 ml) (voir l'appendice 3) et les placer dans un agitateur rotatif (entre 50 et 100 tours/minute) pendant 4 heures à une température inférieure à 24 °C ou pendant 16 à 24 heures s'ils sont réfrigérés, ou

- b) procéder immédiatement au broyage des segments dans un sac de macération résistant (par exemple Stomacher ou Bioreba) avec un volume approprié de tampon d'extraction (voir l'appendice 3), en utilisant un maillet en caoutchouc ou un dispositif de broyage approprié (Homex, par exemple). A défaut, il convient soit de réfrigérer les segments (pour une période inférieure à 72 heures), soit de les conserver à température ambiante (pour une période inférieure à 24 heures).
- 3.2.3 Décanter le liquide surnageant après sédimentation pendant 15 minutes.
- 3.2.4 Il n'est habituellement pas nécessaire de procéder à une nouvelle clarification de l'extrait ou de la concentration de la fraction bactérienne, mais celle-ci peut toutefois être réalisée par filtration et/ou centrifugation selon la méthode décrite aux sections 3.1.4 à 3.1.6.
- 3.2.5 Séparer l'extrait d'échantillon initial ou concentré en deux parties égales. En maintenir une tout au long du test à une température de 4 à 10 °C et entreposer l'autre à une température de -16 à -24 °C (semaines) ou de -68 à -86 °C (mois) après y avoir incorporé 10 à 25 % (en volume) de glycérol stérile, pour le cas où il serait nécessaire de pratiquer un second test.

4. Test d'immunofluorescence

Principe

Compte tenu de sa capacité reconnue à atteindre les seuils requis, il est recommandé d'utiliser le test d'immunofluorescence comme principal test de dépistage.

Si le test d'immunofluorescence est utilisé comme principal test de dépistage et qu'il produit un résultat positif, il y a lieu de pratiquer un test PCR ou FISH à titre de test secondaire. Si le test d'immunofluorescence est utilisé comme test secondaire et qu'il produit un résultat positif, l'analyse doit être complétée par des tests supplémentaires comme indiqué dans le diagramme fonctionnel.

Nota bene: toujours utiliser un anticorps polyclonal lorsque le test d'immunofluorescence est utilisé comme test principal. Lorsqu'un test d'immunofluorescence réalisé avec un anticorps polyclonal produit un résultat positif, un test supplémentaire de l'échantillon avec un anticorps monoclonal peut permettre de gagner en spécificité, mais aussi se révéler moins sensible.

Il convient d'utiliser les anticorps d'une souche de référence de C. m. ssp. sepedonicus. Il est recommandé de déterminer le titre pour chaque nouveau lot d'anticorps. Le titre est défini comme la plus haute dilution à laquelle on obtient une réaction optimale lorsqu'on teste une suspension contenant entre 10⁵ et 10⁶ cellules par millilitre d'une souche homologue de C. m. ssp. sepedonicus en utilisant un conjugué approprié d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), conformément aux recommandations du fabricant. La solution brute d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux doit présenter un titre d'immunofluorescence d'au moins 1: 2000. Lors du test, les dilution(s) de travail des anticorps doivent être approximativement égales à la moitié du titre. Utiliser des anticorps validés (voir site web à l'adresse: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Le test doit être effectué sur des extraits d'échantillon fraîchement préparés. Le cas échéant, il peut être pratiqué avec succès sur des extraits conservés en solution de glycérol à une température de -68 °C à -86 °C. Le glycérol peut être séparé de l'échantillon par l'ajout d'un ml de tampon d'extrait concentré (voir l'appendice 4), centrifugation pendant 15 minutes à 7 000 g et resuspension dans le même volume de tampon d'extrait concentré. Cela est rarement nécessaire, particulièrement lorsque l'échantillon est fixé à la lame par flambage (voir le point 2.2).

Préparer des lames témoins positives distinctes d'une souche homologue ou de toute autre souche de référence de C. m. ssp. sepedonicus, dans une suspension d'extrait de pomme de terre, comme indiqué dans l'appendice 2 et, éventuellement, dans une solution tampon.

Du tissu infecté naturellement (conservé par lyophilisation ou congélation entre -16 °C et -24 °C) devrait, dans la mesure du possible, être utilisé à titre de témoin similaire sur la même lame.

A titre de témoins négatifs, utiliser des aliquotes d'extrait d'échantillon ayant préalablement produit un résultat négatif lors de tests.

Utiliser des lames multipuits de microscope dotées de préférence de 10 fenêtres d'au moins 6 mm de diamètre. Tester le matériel de contrôle de la même façon que les échantillons.

4.1 Préparer les lames en utilisant l'une des méthodes suivantes:

- i) Extraits finaux contenant relativement peu d'amidon
Déposer à la pipette sur la première fenêtre un volume standard (15 µl conviennent pour un diamètre de fenêtre de 6 mm; choisir une quantité plus importante pour les fenêtres de plus grand diamètre) d'une solution au 1/100^e de l'extrait concentré de pomme de terre remis en suspension. Ensuite, déposer à la pipette un volume similaire d'extrait concentré non dilué (1/1) sur les fenêtres restantes de la rangée. La rangée suivante peut faire office de double ou servir à un deuxième échantillon, comme indiqué à la figure 1.
- ii) Autres extraits
Préparer des dilutions décimales (au 1/10^e, au 1/100^e et au 1/1000^e) de l'extrait concentré remis en suspension dans la solution tampon. Déposer à la pipette sur une rangée de fenêtres un volume standard (15 µl conviennent pour un diamètre de fenêtre de 6 mm; choisir une quantité plus

importante pour les fenêtres de plus grand diamètre) de la suspension d'extrait pur et de chaque dilution. La rangée suivante peut faire office de double ou servir à un deuxième échantillon, comme indiqué à la figure 2.

- 4.2 Faire sécher les gouttes à température ambiante ou par chauffage à des températures comprises entre 40 °C et 45 °C. Fixer les cellules bactériennes sur la lame par chauffage (15 minutes à 60 °C), par flambage, à l'aide d'éthanol à 95° ou suivant les instructions spécifiques des fournisseurs des anticorps.

En cas de besoin, des lames fixées peuvent alors être réfrigérées et entreposées dans une boîte à dessiccation, pour la plus courte durée possible (jusqu'à un maximum de 3 mois) avant un nouveau test.

4.3 Procédure du test d'immunofluorescence

- i) Conformément à la méthode de préparation des lames de test indiquée au point 4.1.i):
préparer une série de dilutions au demi de l'anticorps dans un tampon d'immunofluorescence. Le premier puits doit recevoir 1/2 du titre (T/2), les autres 1/4 du titre (T/4), 1/2 du titre (T/2), le titre (T) et deux fois le titre (2T);
- ii) Conformément à la méthode de préparation des lames de test indiquée au point 4.1.ii):
préparer la dilution de travail de l'anticorps dans un tampon d'immunofluorescence. La dilution de travail a un effet sur la spécificité.

Figure 1. Préparation de la lame de test conformément aux points 4.1 i) et 4.3 i)

		Dilution de l'extrait concentré remis en suspension					
		1/100	1/1	1/1	1/1	1/1	☐ Dilution d'extrait concentré remis en suspension
(T = titre)		T/2	T/4	T/2	T	2T	☐ Dilution au demi de l'antisérum/anticorps
Echantillon 1		● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
	Double de l'échantillon 1 ou de l'échantillon 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

Figure 2. Préparation de la lame de test conformément aux points 4.1 ii) et 4.3 ii)

		Dilution de travail de l'antisérum/anticorps					
		1/1	1/10	1/100	vide	vide	☐ Dilution au dixième d'extrait concentré remis en suspension
Echantillon 1		● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
	Double de l'échantillon 1 ou de l'échantillon 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

- 4.3.1 Disposer les lames sur du papier humide. Couvrir complètement chaque fenêtre de test avec une ou plusieurs dilutions d'anticorps. Le volume d'anticorps appliqué sur chaque fenêtre doit être au moins équivalent au volume d'extrait appliqué.

En l'absence d'instructions spécifiques des fournisseurs des anticorps, appliquer la procédure suivante:

- 4.3.2 faire incuber les lames sur du papier humide et sous cloche pendant 30 minutes, à température ambiante (18 à 25 °C);

- 4.3.3 éliminer les gouttelettes de chaque lame et rincer soigneusement dans une solution tampon pour immunofluorescence. Laver par immersion pendant cinq minutes dans une solution tampon IF-Tween (voir l'appendice 3) puis encore cinq minutes dans une solution tampon IF. Eviter toute vaporisation ou débordement qui pourrait entraîner une contamination croisée. Éliminer précautionneusement au buvard l'humidité excédentaire;
- 4.3.4 disposer les lames sur du papier humide. Couvrir les fenêtres de test avec du conjugué FITC à la dilution utilisée lors du titrage. Le volume de conjugué appliqué sur les fenêtres doit être identique au volume d'anticorps utilisé;
- 4.3.5 faire incuber les lames sur du papier humide et sous cloche pendant 30 minutes, à température ambiante (18 à 25 °C);
- 4.3.6 éliminer de la lame les gouttes de conjugué. Rincer et laver comme indiqué ci-dessus (point 4.3.3). Éliminer avec soin l'humidité excédentaire.
- 4.3.7 dans chaque fenêtre, déposer à la pipette 5 à 10 µl d'une solution de glycérol tamponnée au phosphate à 0,1 M (voir l'appendice 3) ou un support antidécoloration du commerce, puis couvrir d'une lamelle.
- 4.4 Lecture du test d'immunofluorescence
 - 4.4.1 Examiner les lames de test à l'aide d'un microscope à épifluorescence et de filtres adaptés à l'excitation de l'isothiocyanate de fluorescéine, en immersion dans l'huile ou dans l'eau et avec un grossissement de 500 à 1 000. Examiner les fenêtres selon deux diamètres perpendiculaires et en suivant le pourtour. Pour les échantillons ne présentant pas de cellules ou n'en présentant qu'un faible nombre, observer au moins 40 champs microscopiques.
Commencer par contrôler la lame du témoin positif. Les cellules doivent présenter une fluorescence vive et être complètement colorées au titre d'anticorps ou de dilution de travail déterminés. En cas de coloration aberrante, le test IF (section 4) doit être réitéré.
 - 4.4.2 Rechercher dans les fenêtres des lames de test la présence de cellules présentant une fluorescence vive et une morphologie caractéristique de *C. m. ssp. sepedonicus* (voir site web à l'adresse <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). L'intensité de la fluorescence doit être équivalente à celle de la souche témoin positive pour une dilution d'anticorps identique. Les cellules dont la coloration est incomplète ou qui présentent une faible fluorescence ne doivent pas être prises en considération.
Au moindre soupçon de contamination, le test doit être recommencé. Cela peut être le cas si toutes les lames d'un lot montrent des cellules positives en raison de la contamination du tampon ou si des cellules positives sont isolées (hors des fenêtres) sur le milieu de montage de la lame.
 - 4.4.3 Il existe un certain nombre de problèmes inhérents à la spécificité du test d'immunofluorescence. Des populations indésirables de cellules fluorescentes morphologiquement atypiques et de bactéries saprophytes provoquant des réactions croisées qui présentent une taille et une morphologie similaires à *C. m. sepedonicus* risquent fort d'apparaître dans les extraits de cônes de talons et de segments de tiges de pommes de terre.
 - 4.4.4 Seules les cellules fluorescentes présentant une taille et une morphologie caractéristiques au titre ou à la dilution de travail des anticorps visés au point 4.3 doivent être prises en considération.
 - 4.4.5 Interprétation du test d'immunofluorescence
 - i) Si l'échantillon contient des cellules présentant une fluorescence vive et une morphologie caractéristique, évaluer le nombre moyen de cellules caractéristiques par champ microscopique et calculer le nombre de ces cellules par millilitre d'extrait concentré remis en suspension (voir l'appendice 4).
La lecture du test d'immunofluorescence est considérée comme positive lorsque l'échantillon contient au moins 5×10^3 cellules caractéristiques par millilitre d'extrait concentré remis en suspension. L'échantillon est alors considéré comme potentiellement contaminé et il y a lieu de poursuivre les tests.
 - ii) La lecture du test d'immunofluorescence est considérée comme négative si l'échantillon contient moins de 5×10^3 cellules par millilitre d'extrait concentré remis en suspension et l'échantillon est considéré comme non contaminé. Il n'est pas utile de poursuivre les tests.

5. TEST FISH

Principe

Si le test FISH est utilisé comme test de dépistage initial et qu'il produit un résultat positif, il y a lieu de pratiquer un test d'immunofluorescence à titre de deuxième test de dépistage obligatoire. Si le test FISH est utilisé comme test secondaire et qu'il produit un résultat positif, le diagnostic doit être complété par des tests supplémentaires comme indiqué dans le diagramme fonctionnel.

Nota bene: utiliser des oligo-sondes validées spécifiques de *C. m. ssp. sepedonicus* (voir l'appendice 7). Les tests préliminaires réalisés suivant cette méthode doivent permettre la détection reproductible d'au moins 10^3 à 10^4 cellules/ml de *C. m. ssp. sepedonicus* ajoutées aux extraits d'échantillons ayant donné antérieurement des résultats négatifs.

Il est préférable d'appliquer la procédure décrite ci-après à des extraits d'échantillon fraîchement préparés, mais elle peut également fonctionner avec des extraits d'échantillon conservés en solution de glycérol à des températures de -16 °C à -24 °C ou de -68 °C à -86 °C.

A titre de témoins négatifs, utiliser des aliquotes d'extrait d'échantillon ayant préalablement produit un résultat négatif lors de tests de recherche de *C. m. ssp. sepedonicus*.

A titre de témoins positifs, préparer des suspensions contenant entre 10^5 et 10^6 cellules/ml de *C. m. ssp. sepedonicus* (souches NCPPB 4053 ou PD 406, par exemple) dans une solution tampon phosphatée à 0,01 M, à partir d'une culture de trois à cinq jours (voir l'appendice 2 pour la préparation). Préparer des lames témoins positives distinctes de la souche homologue ou de toute autre souche de référence de *C. m. ssp. sepedonicus*, dans une suspension d'extrait de pomme de terre, comme indiqué dans l'appendice 2.

L'utilisation d'une oligo-sonde eubactérienne marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) permet de contrôler le processus d'hybridation en colorant toutes les eubactéries présentes dans l'échantillon.

Tester le matériel de contrôle de la même façon que les échantillons.

5.1 Fixation de l'extrait de pomme de terre

Le protocole exposé ci-après est basé sur Wullings et *al.*, (1998).

- 5.1.1 Préparer la solution de fixation (voir l'appendice 7).
- 5.1.2 Introduire à la pipette 100 µl de chaque extrait dans un tube Eppendorf et centrifuger pendant 8 minutes à 7000 g.
- 5.1.3 Eliminer le liquide surnageant et dissoudre l'extrait concentré dans 500 µl de fixatif préparé moins de 24 heures auparavant. Passer au vortex et laisser incubé toute la nuit à 4 °C.
On peut également utiliser de l'éthanol à 96 % comme fixatif. Dans ce cas, dissoudre l'extrait concentré visé au point 5.1.2 dans un mélange constitué de 50 µl de tampon phosphaté à 0,01 M et de 50 µl d'éthanol à 96 %. Mélanger au vortex et laisser incubé à 4 °C pendant 30 à 60 minutes.
- 5.1.4 Centrifuger pendant 8 minutes à 7000 g, éliminer le liquide surnageant et remettre l'extrait concentré en suspension dans 75 µl de tampon phosphaté à 0,01 M.
- 5.1.5 Déposer 16 µl des suspensions fixées sur une lame multitest comme indiqué à la figure 3. Sur chaque lame, appliquer deux échantillons différents, non dilués, et en diluer 10 µl à 1:100 (dans un tampon phosphaté à 0,01 M). Le reste de la solution d'échantillon (49 µl) peut être conservé à -20 °C après addition d'un volume d'éthanol à 96 %. S'il y a lieu de réitérer le test FISH, éliminer l'éthanol par centrifugation et le remplacer par un volume équivalent de tampon phosphaté à 0,01 M (homogénéiser au vortex).

Figure 3 – Disposition d'une lame pour test FISH

	Echantillon 1	Témoin	Témoin	Témoin	Echantillon 2
	○	○	○	○	○
	fenêtre 1	fenêtre 2	fenêtre 3	fenêtre 4	fenêtre 5
	Echantillon 1	Témoin	Témoin	Témoin	Echantillon 2
	○	○	○	○	○
	fenêtre 6	fenêtre 7	fenêtre 8	fenêtre 9	fenêtre 10

Lamelle 1

Lamelle 2

- 5.1.6 Sécher les lames à l'air (ou dans un séchoir, à 37 °C), puis les fixer par flambage.
- Il est possible d'interrompre la procédure à ce stade et d'entamer l'hybridation le lendemain. Les lames doivent être entreposées à l'abri de la poussière, dans un lieu sec et à température ambiante.

5.2 Préhybridation et hybridation

- 5.2.1 Préparer une solution de lysozyme à raison de 10 mg de lysozyme (Sigma L-6876) pour 10 ml de tampon (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8,0). Cette solution peut être conservée, mais ne doit être congelée et dégelée qu'une fois. Couvrir intégralement chaque échantillon d'environ 50 µl de solution de lysozyme et laisser incuber 10 minutes à température ambiante, puis plonger une seule fois les lames dans de l'eau déminéralisée et les sécher au papier filtre.

Autre possibilité: dans chaque puits, en remplacement du lysozyme, ajouter au tampon (2 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl₂, pH 7,4) 50 µl de protéinase K à 40-400 µg/ml, puis laisser incuber à 37 °C pendant 30 minutes.

- 5.2.2 Déshydrater les cellules par bains successifs d'éthanol à 50 %, 80 % et 96 % d'une minute chacun. Disposer les lames sur un support et les laisser sécher à l'air libre.
- 5.2.3 Préparer une chambre d'incubation humide en tapissant le fond d'une boîte hermétique de papier absorbant ou de papier filtre imprégné d'hybmix 1x (voir l'appendice 7). Faire préincuber la boîte pendant au moins 10 minutes dans le four à hybridation, à une température de 55 °C.
- 5.2.4 Préparer la solution d'hybridation (voir l'appendice 7) à raison de 45 µl par lame, puis faire préincuber pendant cinq minutes à 55 °C.
- 5.2.5 Disposer les lames sur une plaque chauffante à 45 °C et verser 10 µl de solution d'hybridation dans chacun des quatre puits de chaque lame.
- 5.2.6 Couvrir chaque lame de deux lamelles (24 x 24 mm) en ayant soin de ne pas emprisonner d'air, puis placer les lames dans la chambre d'hybridation humide préchauffée et les y laisser une nuit, dans l'obscurité et à une température de 55 °C, pour permettre le déroulement de l'hybridation.
- 5.2.7 Préparer trois béchers contenant 1 l d'eau ultrapure, 1 l d'hybmix 1x (334 ml d'hybmix 3x et 666 ml d'eau ultrapure) et 1 l d'hybmix 1/2x (167 ml d'hybmix 3x et 833 ml d'eau ultrapure).
Faire préincuber chacun de ces béchers au bain-marie, à 55 °C.
- 5.2.8 Débarrasser les lames des lamelles et les placer sur un support.
- 5.2.9 Eliminer l'excédent de sonde en procédant par incubation pendant 15 mn à 55 °C dans le bécher contenant l'hybmix 1x.
- 5.2.10 Transférer le support à lames dans une solution de lavage à l'hybmix 1/2 et laisser incubé pendant 15 mn supplémentaires.
- 5.2.11 Plonger brièvement les lames dans un bain d'eau ultrapure et sécher au papier filtre. Eliminer l'humidité excédentaire en disposant doucement du papier filtre sur la surface à sécher.
Verser à la pipette dans chaque fenêtre entre 5 et 10 µl de solution support anti-décoloration (par exemple, Vectashield de Vecta Laboratories, CA, USA ou équivalente) et couvrir toute la surface de la lame d'une grande lamelle (24 x 60 mm).

5.3 Lecture du test FISH

- 5.3.1 Procéder immédiatement à l'observation des lames au moyen d'un microscope à épifluorescence, sous un film d'huile et à un grossissement de 630 à 1 000 x. Avec un filtre adapté à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), les cellules eubactériennes (y compris la plupart des cellules gram-négatives) présentes dans l'échantillon prennent une coloration verte fluorescente. Avec un filtre adapté à la tétraméthylrhodamine-5-isothiocyanate, les cellules de *C. m. ssp. sepedonicus* marquées au Cy3 apparaissent en rouge fluorescent. Comparer la morphologie des cellules avec celle des témoins positifs. Les cellules doivent être entièrement colorées et présenter une fluorescence vive. En cas de coloration aberrante, le test FISH (section 9,4) doit être réitéré. Examiner les fenêtres selon deux diamètres perpendiculaires et en suivant le pourtour. Pour les échantillons ne présentant pas ou ne présentant qu'un faible nombre de cellules, observer au moins 40 champs microscopiques.
- 5.3.2 Rechercher dans les fenêtres des lames de test la présence de cellules présentant une fluorescence vive et une morphologie caractéristique de *C. m. ssp. sepedonicus* (voir site web à l'adresse <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). L'intensité de la fluorescence doit être équivalente ou supérieure à celle de la souche témoin positive. Les cellules dont la coloration est incomplète ou qui présentent une faible fluorescence ne doivent pas être prises en considération.
- 5.3.3 Au moindre soupçon de contamination, le test doit être recommencé. Cela peut être le cas si toutes les lames d'un lot montrent des cellules positives en raison de la contamination du tampon ou si des cellules positives sont isolées (hors des fenêtres) sur le milieu de montage de la lame.
- 5.3.4 Il existe un certain nombre de problèmes inhérents à la spécificité du test FISH. Des populations indésirables de cellules fluorescentes morphologiquement atypiques et de bactéries saprophytes provoquant des réactions croisées qui présentent une taille et une morphologie similaires à *C. m. ssp. sepedonicus* sont susceptibles d'apparaître dans les extraits de cônes de talons et de segments de tiges de pommes de terre. Ce phénomène est toutefois beaucoup moins fréquent que dans le cas du test d'immunofluorescence.
- 5.3.5 Seules les cellules fluorescentes présentant une taille et une morphologie caractéristiques doivent être prises en considération (voir le point 5.3.2).
- 5.3.6 Interprétation du résultat du test FISH
 - i) Les résultats du test FISH sont valides lorsqu'on observe des cellules présentant une fluorescence vive de couleur verte ainsi qu'une taille et une morphologie caractéristiques de *C. m. ssp. sepedonicus* en utilisant le filtre FITC et des cellules présentant une fluorescence vive de couleur rouge en utilisant le filtre rhodamine dans tous les témoins positifs mais dans aucun témoin négatif. Si l'échantillon contient des cellules présentant une fluorescence vive et une morphologie caractéristique, évaluer le nombre moyen de cellules caractéristiques par champ

microscopique et calculer le nombre de ces cellules par millilitre d'extrait concentré remis en suspension (voir l'appendice 4). Les échantillons contenant au moins 5×10^3 cellules caractéristiques par millilitre d'extrait concentré remis en suspension sont considérés comme potentiellement contaminés. Il y a lieu de poursuivre les tests. Les échantillons contenant moins de 5×10^3 cellules caractéristiques par millilitre d'extrait concentré remis en suspension sont considérés comme négatifs.

- ii) Le test FISH est négatif si l'on n'observe pas, en utilisant le filtre rhodamine, de cellules de la taille et de la morphologie caractéristiques de *C. m. ssp. sepedonicus* qui présentent une fluorescence vive de couleur rouge, pour autant que des cellules caractéristiques présentant une fluorescence vive de couleur rouge soient observées avec le filtre rhodamine dans les préparations de témoins positifs.

6. TEST PCR

Principes

Si le test PCR est utilisé comme principal test de dépistage et qu'il produit un résultat positif, il y a lieu de pratiquer un test d'immunofluorescence à titre de second test de dépistage obligatoire. Si le test PCR est utilisé comme test secondaire et qu'il produit un résultat positif, le diagnostic doit être complété par des tests supplémentaires comme indiqué dans le diagramme fonctionnel.

L'exploitation complète de cette méthode en tant que test de dépistage principal n'est recommandée que lorsqu'une expertise spécialisée a été acquise en la matière.

Nota bene: les tests préliminaires réalisés suivant cette méthode doivent permettre la détection reproductible de 103 à 104 cellules/ml de *C. m. ssp. sepedonicus* ajoutées aux extraits d'échantillons ayant donné antérieurement des résultats négatifs. Des expériences d'optimisation peuvent se révéler nécessaires pour obtenir des niveaux maxima de sensibilité et de spécificité dans tous les laboratoires.

Utiliser des réactifs et des protocoles PCR validés. Sélectionner de préférence une méthode avec contrôle interne.

Prendre les précautions nécessaires pour éviter la contamination de l'échantillon par de l'ADN cible. Afin de réduire autant que possible la possibilité de contamination par de l'ADN cible, il conviendrait que le test PCR soit réalisé par des techniciens expérimentés, dans des laboratoires de biologie moléculaire spécialisés.

Les témoins négatifs (en ce qui concerne les procédures de PCR et d'extraction d'ADN) doivent toujours être traités comme échantillons finaux dans la procédure, afin de faire apparaître si un transfert d'ADN est intervenu.

Il convient d'inclure les témoins négatifs suivants dans le test PCR:

- extrait d'échantillon ayant produit précédemment des résultats négatifs pour *C. m. ssp. sepedonicus*,
- tampons témoins utilisés pour extraire la bactérie et l'ADN de l'échantillon,
- mélange réactif destiné au PCR.

De même, il convient d'y inclure les témoins positifs suivants:

- aliquotes d'extraits finaux remis en suspension après ajout de *C. m. ssp. sepedonicus* (voir l'appendice 2 pour la préparation),
- suspension en milieu aqueux de 10^6 cellules par millilitre d'un isolat virulent de *C. m. ssp. sepedonicus* (par exemple: NCPPB 2140 ou NCPPB 4053),
- utilisation également, si possible, d'ADN extrait d'échantillons témoins positifs lors du test PCR.

Pour éviter les risques de contamination, préparer les témoins positifs dans un environnement distinct de celui des échantillons à tester.

Autant que possible, les extraits d'échantillons doivent être exempts de terre. Dans certains cas, il pourrait donc être recommandable de préparer des extractions de pommes de terre lavées s'il est prévu d'utiliser des protocoles PCR.

6.1 Méthodes de purification de l'ADN

Utiliser des échantillons témoins positifs et négatifs selon la méthode décrite ci-dessus.

Préparer le matériel de contrôle de la même façon que les échantillons.

Il existe toute une série de méthodes pour la purification de l'ADN cible dans le cas de substrats d'échantillons complexes, en vue d'éliminer les inhibiteurs de la PCR et d'autres réactions enzymatiques et de concentrer l'ADN cible dans l'extrait d'échantillon.

La méthode suivante a été optimisée pour une utilisation avec la méthode PCR validée décrite à l'appendice 6.

6.1. a) Méthode de Pastrik (2000)

1. Déposer à la pipette 220 µl de tampon lyse (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) dans un tube Eppendorf de 1,5 ml.

2. Ajouter 100 µl d'extrait d'échantillon et le placer dans un bloc chauffant ou un bain-marie à 95 °C pendant dix minutes.
3. Déposer le tube sur de la glace pendant cinq minutes.
4. Ajouter 80 µl de solution concentrée de lysozyme (50 mg de lysozyme par millilitre dans 10 mM Tris HCl, pH 8,0) et laisser incubé à 37 °C pendant 30 minutes.
5. Ajouter 220 µl d'Easy DNA® solution A (Invitrogen), bien homogénéiser au vortex et laisser incubé à 65 °C pendant 30 minutes.
6. Ajouter 100 µl d'Easy DNA® solution B (Invitrogen), homogénéiser vigoureusement au vortex jusqu'à ce que le précipité circule librement dans le tube et que l'échantillon présente une viscosité uniforme.
7. Ajouter 500 µl de chloroforme et homogénéiser au vortex jusqu'à ce que la viscosité diminue et que le mélange soit homogène.
8. Centrifuger à 15 000 g pendant 20 minutes à 4 °C pour séparer les phases et former l'interphase.
9. Verser la phase supérieure dans un nouveau tube Eppendorf.
10. Ajouter 1 millilitre d'éthanol à 100 % (-20 °C), homogénéiser brièvement au vortex et laisser incubé sur de la glace pendant 10 minutes.
11. Centrifuger à 15 000 g pendant 20 minutes à 4 °C et éliminer l'éthanol de l'extrait concentré.
12. Ajouter 500 µl d'éthanol à 80 % (-20 °C) et mélanger en retournant le tube.
13. Centrifuger à 15 000 g pendant 10 minutes à 4 °C, conserver l'extrait concentré et éliminer l'éthanol.
14. Laisser sécher l'extrait à l'air libre ou dans un DNA Speed Vac.
15. Remettre en suspension l'extrait concentré dans 100 µl d'eau ultrapure stérile et le laisser à température ambiante pendant au moins 20 minutes.
16. Le conserver à -20 °C jusqu'au moment de l'utiliser pour la PCR.
17. Isoler tout précipité blanc par centrifugation et utiliser 5 µl du liquide surnageant contenant l'ADN pour la PCR.

6.1. b) Autres méthodes

D'autres méthodes d'extraction de l'ADN (Qiagen DNeasy Plant Kit, par exemple) peuvent être appliquées, à condition qu'elles soient d'une efficacité reconnue comme équivalente pour la purification d'ADN issu d'échantillons témoins contenant entre 10^3 et 10^4 cellules d'agent pathogène par millilitre.

6.2 PCR

- 6.2.1 Préparer les matrices de test et de contrôle pour la PCR suivant les protocoles validés (voir l'appendice 6). Préparer une dilution décimale de l'extrait d'ADN issu de l'échantillon (1:10 dans de l'eau ultrapure).
- 6.2.2 Préparer le mélange réactif destiné à la PCR dans un environnement exempt de toute contamination suivant les protocoles publiés (voir l'appendice 6). Le protocole PCR validé est une réaction multiplex qui intègre également un contrôle PCR interne.
- 6.2.3 Ajouter 5 µl d'extrait d'ADN à 25 µl de réactif PCR dans des tubes PCR stériles.
- 6.2.4 Constituer un échantillon témoin négatif ne contenant que le mélange réactif destiné à la PCR et ajouter à la place de l'échantillon une eau ultrapure de même provenance que celle utilisée dans le mélange PCR.
- 6.2.5 Placer les tubes dans le même cycleur thermique que celui utilisé lors du test préliminaire et lancer le programme PCR optimisé comme il convient (voir l'appendice 6).

6.3 Analyse du produit de la réaction PCR

- 6.3.1 Décoder les amplimères PCR par électrophorèse sur gel d'agarose. Soumettre à une tension de 5 à 8 V/cm une quantité d'au moins 12 µl de mélange réactif d'ADN amplifié provenant de chaque échantillon, associé à 3 µl de tampon de lest (appendice 6) sur des gels d'agarose à 2,0 % dans un tampon d'EDTA (TAE) tris-acétate (appendice 6). Utiliser un marqueur d'ADN approprié, comme le «100 bp ladder».
- 6.3.2 Pour révéler les bandes d'ADN, utiliser la coloration au bromure d'éthidium (à 0,5 mg/l) pendant une période 30 à 45 minutes, en prenant les **précautions qui s'imposent pour la manipulation de cet agent mutagène**.
- 6.3.3 Dans le cas des produits PCR présentant la taille attendue (appendice 6), visualiser le gel coloré par diaphanoscopie sous UV ondes courtes (par exemple, $\lambda = 302$ nm) et noter les résultats.

- 6.3.4 Pour tous les nouveaux cas/résultats, vérifier l'authenticité de l'amplimère en pratiquant une analyse de restriction enzymatique sur un échantillon de l'ADN amplifié restant. A cet effet, faire incubé à température optimale sur une durée optimale, en employant un enzyme et un tampon appropriés (voir l'appendice 6). Décoder les fragments digérés par électrophorèse sur gel d'agarose selon la méthode indiquée plus haut et visualiser par diaphanoscopie sous UV la disposition caractéristique des fragments après restriction enzymatique et coloration au bromure d'éthidium. Comparer ensuite avec les témoins positifs pré et post-digestion.

Interprétation du résultat du test PCR

Le test PCR est négatif si l'on met en évidence l'amplimère PCR spécifique de *C. m. ssp. sepedonicus* de la taille attendue pour l'ensemble des échantillons témoins positifs, mais pas pour l'échantillon concerné (dans le cas d'un PCR multiplex avec amorces de contrôle interne spécifiques à la plante, un second produit PCR de la taille attendue doit être amplifié avec l'échantillon concerné).

Le test PCR est positif si l'on met en évidence l'amplimère PCR spécifique de *C. m. ssp. sepedonicus*, présentant la taille et (au besoin) la disposition post-restriction attendues, à condition qu'il ne soit pas amplifié par l'un des échantillons témoins négatifs. On peut également confirmer avec fiabilité un résultat positif en recommençant le test avec une deuxième série d'amorces PCR (voir la section 9.3).

Nota bene: on peut suspecter une inhibition du PCR si l'amplimère attendu est obtenu à partir de l'échantillon témoin positif contenant C. m. ssp. sepedonicus en solution aqueuse alors que les témoins positifs contenant C. m. ssp. sepedonicus dans de l'extrait de pomme de terre produisent un résultat négatif. Dans les protocoles PCR multiplex avec contrôles PCR internes, l'inhibition de la réaction est probable quand on n'obtient aucun des deux amplimères.

On peut suspecter une contamination si l'amplimère attendu est mis en évidence dans un au moins des témoins négatifs.

7. TEST BIOLOGIQUE

*Nota bene: les tests préliminaires réalisés suivant cette méthode doivent permettre la détection reproductible de 10^3 à 10^4 cellules/ml de *C. m. ssp. sepedonicus* formant des colonies, ajoutées aux extraits d'échantillons ayant donné antérieurement des résultats négatifs (pour la préparation, voir l'appendice 2).*

Pour obtenir le plus haut degré de sensibilité de détection, il est préférable d'utiliser un extrait d'échantillon fraîchement préparé, dans des conditions de croissance optimales. Toutefois la méthode peut être appliquée avec succès à des extraits conservés en solution de glycérol entre -68 °C et -86 °C.

Certaines variétés d'aubergine constituent un excellent milieu d'enrichissement sélectif pour la culture de *C. m. ssp. sepedonicus*, même en l'absence de symptômes, et permettent également de réaliser un excellent test de confirmation sur hôte.

Pour réduire le risque d'obtenir des résultats faussement négatifs, les conditions de croissance doivent être optimales.

Pour les détails de la culture, voir l'appendice 8.

- 7.1 Répartir sur des aubergines, selon l'une des méthodes indiquées plus bas (points 7.3 ou 7.4), la totalité du reste de l'aliquote de test d'extrait concentré remis en suspension obtenu comme indiqué aux sections 3.1.6 ou 3.2.5. Utiliser uniquement des plants au stade de la deuxième ou de la troisième feuille, jusqu'au développement complet de la troisième vraie feuille. Pour utiliser intégralement l'extrait concentré remis en suspension et assurer l'efficacité de l'inoculation, l'exécution des procédures décrites ci-après requiert entre 15 et 25 aubergines par échantillon.
- 7.2 Avant l'inoculation, ne pas arroser les aubergines pendant une ou deux journées afin de réduire la pression de turgescence.
- 7.3 Inoculation par incision
 - 7.3.1 Tenir le plant entre deux doigts et déposer à la pipette sur la tige, entre les cotylédons et la première feuille, une goutte (environ 5 à 10 µl) d'extrait concentré en suspension.
 - 7.3.2 A l'aide d'un scalpel stérile, pratiquer, en partant de la goutte d'extrait concentré, une incision diagonale d'une longueur de 1,0 cm et d'une profondeur égale approximativement aux deux tiers de l'épaisseur de la tige.
 - 7.3.3 Refermer l'incision avec de la vaseline stérile au moyen d'une seringue.
- 7.4 Inoculation par injection
 - 7.4.1 A l'aide d'une seringue munie d'une aiguille hypodermique (pas moins de 23 G), pratiquer l'inoculation dans les tiges d'aubergine juste au-dessus des cotylédons. Répartir l'échantillon entre les aubergines.
- 7.5 A titre de témoins positifs, inoculer cinq plants par la même méthode (voir les points 7.3 ou 7.4) avec une suspension aqueuse contenant entre 10^5 et 10^6 cellules/ml d'une culture connue de *C. m. ssp. sepedonicus*, et, si possible, avec de l'extrait de tubercule naturellement infecté (voir la section 4).
- 7.6 A titre de témoins négatifs, inoculer cinq plants par la même méthode (voir les points 7.3 ou 7.4) avec une solution tampon stérile d'extrait concentré.

- 7.7 Laisser incuber les plants jusqu'à quatre semaines entre 18 °C et 24 °C dans des locaux adaptés aux conditions de quarantaine. Pendant l'incubation, maintenir une lumière suffisante et un degré élevé d'humidité (de 70 % à 80 %), en assurant un arrosage approprié pour prévenir tout engorgement hydrique ou flétrissement de sécheresse. Les cellules de *C. m. sepedonicus* ne résistent pas à des températures supérieures à 30 °C; leur température idéale de culture se situe à 21 °C. Pour éviter les risques de contamination, faire incuber les témoins positifs et négatifs en serre ou phytotron sur des étagères nettement séparées ou, si la place est limitée, prévoir un compartimentage rigoureux. Si des plants correspondant à des échantillons différents doivent être incubés à proximité les uns des autres, les séparer à l'aide d'écrans appropriés. Prendre grand soin d'éviter toute contamination croisée lors de la fertilisation, de l'arrosage, des inspections et de toute autre manipulation. Il est essentiel d'éviter toute présence d'insectes dans les serres ou les phytotrons, car ils sont susceptibles de disséminer la bactérie d'un échantillon à l'autre.
- 7.8 Au bout d'une semaine, examiner régulièrement les plants pour y déceler l'apparition de symptômes. Dénombrer les plants présentant des symptômes. Le *C. m. ssp. sepedonicus* provoque chez l'aubergine un flétrissement des feuilles qui peut se manifester en premier lieu par une flaccidité sur les bords ou entre les nervures. Au départ, le tissu flétri peut prendre une couleur vert foncé ou un aspect tacheté, mais il pâlit avant de se nécroser. Les flétrissures entre les nervures présentent souvent l'aspect grasseux de tissus gorgés d'eau. Le tissu nécrosé présente souvent un bord jaune vif. Les plants ne meurent pas nécessairement. Plus les symptômes tardent à apparaître, plus les chances de survie sont élevées. Les plants peuvent surmonter l'infection. Les jeunes aubergines sont considérablement plus sensibles à de faibles populations de *C. m. ssp. sepedonicus* que les plants plus âgés, d'où la nécessité d'utiliser des plants au stade de la troisième feuille ou juste avant.
- Des flétrissements peuvent également être provoqués par des populations d'autres bactéries ou de champignons présentes dans l'extrait concentré de tissu tuberculaire. Il s'agit entre autres de *Ralstonia solanacearum*, d'*Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* et d'*E. carotovora* ssp. *atroseptica*, d'*Erwinia chrysanthemi*, de *Phoma exigua* var. *foveata*, ainsi que de vastes populations de bactéries saprophytes. *Erwinia chrysanthemi*, en particulier, peut induire au niveau des feuilles des symptômes et un flétrissement très semblables aux symptômes de *C. m. sepedonicus*, à cette seule différence près que les infections à *Erwinia chrysanthemi* provoquent un noircissement des tiges. D'autres types de flétrissements se distinguent de ceux causés par *C. m. ssp. sepedonicus* par le fait que des feuilles ou des plants entiers fanent rapidement. Il est également possible de recourir à une coloration de Gram pour distinguer *C. m. ssp. sepedonicus* d'*Erwinia* spp.
- 7.9 Dès l'apparition de symptômes sur les aubergines, il y a lieu de procéder à de nouvelles opérations d'isolement à partir de segments de tissu provenant des feuilles flétries ou de la tige des plants (pour la macération des tissus, se reporter au point 3.1.3). Désinfecter la surface des feuilles et des tiges d'aubergine en les frottant avec de l'éthanol à 70 %. Effectuer un test IF ou PCR sur la sève d'aubergine et procéder à l'isolement sur un milieu approprié [sélectif] (voir la section 8). Il est aussi possible de préparer une coloration de Gram (voir l'appendice 9). Identifier les cultures pures d'isolats supposés de *C. m. ssp. sepedonicus* et confirmer leur pathogénécité (voir les sections 9 et 10).
- 7.10 Dans certaines circonstances et en particulier si les conditions de culture ne sont pas optimales, *C. m. ssp. sepedonicus* peut être présent dans les aubergines à l'état d'infection latente, même après des périodes d'incubation allant jusqu'à quatre semaines. Si aucun symptôme n'est observé après quatre semaines, effectuer un test IF ou PCR sur un échantillon composite de segments de tiges de 1 cm provenant de chaque plant test, prélevés au-dessus du point d'inoculation. Si le test est positif, pratiquer un nouvel isolement sur un milieu approprié (sélectif), conformément à la procédure exposée à la section 8. Identifier les cultures pures d'isolats supposés de *C. m. ssp. sepedonicus* et confirmer leur pathogénécité (voir les sections 9 et 10).

Interprétation des résultats du test biologique

Les résultats du test biologique sont valides lorsque les plants constituant le témoin positif présentent des symptômes caractéristiques, qu'il est possible d'isoler à nouveau les bactéries sur ces plants et qu'aucun symptôme n'est observé sur les témoins négatifs.

Le test biologique est négatif si les plants tests ne sont pas infectés par *C. m. ssp. sepedonicus*, sous réserve que *C. m. ssp. sepedonicus* soit mis en évidence sur les témoins positifs.

Le test biologique est positif si les plants tests sont infectés par *C. m. ssp. sepedonicus*.

8. ISOLEMENT DE *C. M. SSP. SEPEDONICUS*

Nota bene: le diagnostic ne peut être confirmé que par l'isolement et la mise en évidence, de *C. m. ssp. sepedonicus* (voir la section 9), suivis d'une validation par un test du pouvoir pathogène (voir la section 10). Bien qu'il s'agisse d'un organisme difficile à isoler, il est possible de le faire au départ de tissu présentant des symptômes d'infection.

Il peut toutefois se trouver étouffé par des bactéries saprophytes à croissance rapide, ce qui le rend difficile à isoler directement à partir de l'extrait concentré de tissu de tubercule ou de tige (obtenu aux sections 3.1.6 ou 3.2.5). L'isolement direct de *C. m. ssp. sepedonicus* reste envisageable sur milieu sélectif et à partir d'une dilution appropriée d'extrait concentré, remis en suspension, de cônes de pommes de terre prélevés au talon ou de tiges de pomme de terre.

Les isollements doivent être pratiqués sur tous les tubercules ou segments de tiges de pommes de terre et toutes les aubergines ne présentant aucun symptôme mais pour lesquels le test IF ou PCR pratiqué sur l'échantillon composite (voir la section 7.10) a produit un résultat positif. Le cas échéant, les tiges d'aubergines doivent subir une macération suivant la méthode décrite à la section 3.1.3.

A titre de témoins positifs, préparer des dilutions au dixième d'une suspension de 10^6 ufc/ml de *C. m. ssp. sepedonicus* (par exemple, NCPPB 4053 ou PD 406). Pour éviter toute possibilité de contamination, préparer les témoins positifs totalement à l'écart des échantillons à tester.

Pour chaque lot nouvellement préparé de milieu sélectif, il importe de vérifier qu'il convient bien pour la culture de l'agent pathogène avant de l'utiliser pour tester des échantillons de routine.

Tester le matériel de contrôle de la même façon que les échantillons.

8.1 Etalement sur milieu sélectif

8.1.1 A partir de 100 μ l d'une aliquote d'échantillon d'extrait concentré de pomme de terre remis en suspension ou de sève d'aubergine, effectuer des dilutions au dixième dans un tampon d'extrait concentré (voir l'appendice 3).

8.1.2 Les tentatives d'isolation à partir d'extrait concentré de pomme de terre non dilué se soldent généralement par un échec en raison des difficultés que présentent la culture de *Cms* et de la concurrence des saprophytes. Etant donné que la bactérie est généralement présente en masse dans les tissus infectés, il est le plus souvent possible d'évacuer les saprophytes par dilution tout en conservant l'agent pathogène. Il est donc recommandé de recourir à la technique d'étalement sur lame et d'étaler, à l'aide d'un applicateur («crosse de hockey»), 100 μ l de chaque échantillon, à des dilutions de $1/100^e$ à $1/10\ 000^e$, sur un milieu MTNA ou NCP-88 (voir l'appendice 5).

Nota bene: une autre stratégie peut consister à étaler l'aliquote initiale de 100 μ l d'extrait concentré de pomme de terre sur une première lame gélosée à l'aide d'un applicateur, à étendre en stries sur une deuxième lame le reliquat resté sur l'applicateur et à procéder de même sur une troisième lame. L'applicateur permet ainsi d'obtenir sur les lames un effet de dilution.

8.1.3 Faire incuber les lames à l'abri de la lumière et à des températures comprises entre 21 °C et 23 °C.

8.1.4 Un premier examen des lames, avec comptage, par référence aux lames témoins, des éventuelles colonies d'aspect semblable à *C. m. ssp. sepedonicus*, doit avoir lieu au bout de trois jours. Les comptages suivants sont à effectuer au bout de cinq, sept et enfin dix jours.

8.2 Purification des colonies suspectes

*Nota bene: il y a lieu de repiquer sur milieu YGM les colonies d'aspect semblable à *C. m. ssp. sepedonicus*, à des fins d'inoculation ultérieure d'aubergines et/ou d'identification. Cette opération doit être effectuée avant que les lames ne connaissent un foisonnement excessif, soit de préférence au bout de trois à cinq jours.*

8.2.1 Pratiquer un ensemencement en stries des colonies d'aspect semblable à *C. m. ssp. sepedonicus* sur un des milieux suivants (les formules figurent à l'appendice 5):

gélose nutritive avec dextrose (uniquement pour les repiquages),

gélose avec levure, peptone et glucose,

gélose avec extrait de levure et sels minéraux.

Laisser incuber jusqu'à 10 jours à une température comprise entre 21 °C et 24 °C.

C. m. ssp. sepedonicus se multiplie lentement et produit généralement en dix jours des colonies de la taille et de la forme d'une tête d'épingle, convexes et de couleur crème (des photographies de colonies caractéristiques de *C. m. ssp. sepedonicus* sont présentées à l'adresse <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

8.2.2 Ensemencer à nouveau en stries pour obtenir des cultures pures.

Les taux de croissance sont meilleurs pour les repiquages. Les colonies caractéristiques sont de couleur crème ou ivoire, parfois jaune, arrondies, lisses, gonflées, convexes et de consistance mucoïde à fluidale. Elles possèdent des bords bien dessinés et leur diamètre s'étend généralement de 1 à 3 mm.

Une simple coloration de Gram (voir l'appendice 9) peut aider à sélectionner des colonies en vue de tests supplémentaires.

8.2.3 Identifier les cultures supposées (voir la section 9) et réaliser un test du pouvoir pathogène (voir la section 10).

9. IDENTIFICATION

Identifier des cultures pures d'isolats supposés de *C. m. ssp. sepedonicus* en utilisant au moins deux des tests suivants, fondés sur des principes biologiques différents.

Le cas échéant, inclure des souches de référence connues pour chaque test effectué.

9.1 Tests d'identification nutritionnels et enzymatiques

Rechercher les caractéristiques phénotypiques ci-après qui sont systématiquement présentes ou absentes chez *C. m. ssp. sepedonicus*, suivant les méthodes de Lelliott et Stead (1987), Klement *et al.* (1990), Schaad (2001), Anonyme (1987).

Tous les milieux doivent incuber à 21 °C et être examinés au bout de six jours. Si l'on ne constate aucune multiplication, laisser incuber jusqu'à 20 jours.

Chaque test doit inclure une souche connue de *C. m. ssp. sepedonicus* à titre de témoin. Les tests nutritionnels et physiologiques doivent être effectués sur de l'inoculat provenant de repiquages sur gélose nutritive. Les comparaisons morphologiques doivent se faire à partir de cultures sur gélose nutritive avec dextrose.

Tests

Résultats attendus

Oxydation/fermentation (O/F)	Inerte ou faiblement oxydant
Oxydase	–
Croissance à 37 °C	–
Activité uréasique	–
Hydrolyse de l'esculine	+
Hydrolyse de l'amidon	– ou faible
Tolérance d'une solution de NaCl à 7 %	–
Production d'indole	–
Activité de la catalase	+
Production de H ₂ S	–
Utilisation du citrate	–
Liquéfaction de la gélatine	–
Production d'acide à partir de glycérol	–
Production d'acide à partir de lactose	– ou <u>faible</u>
Production d'acide à partir de rhamnose	–
Production d'acide à partir de salicine	–
Coloration de Gram (voir l'appendice 9)	+

9.2 Test d'immunofluorescence (IF)

- Préparer une suspension d'environ 10⁶ cellules par millilitre dans un tampon d'immunofluorescence (voir l'appendice 3).
- Préparer une dilution au demi d'un antisérum approprié.
- Suivre la procédure du test d'immunofluorescence (voir section 4).
- Pour qu'un test IF soit positif, le titre obtenu avec la culture doit être équivalent à celui obtenu avec le témoin positif.

9.3 Test PCR

- Préparer une suspension d'environ 10⁶ cellules par millilitre dans de l'eau ultrapure.
- Dans un bloc chauffant ou dans un bain d'eau bouillante, chauffer 100 µl de la suspension dans des tubes fermés à 100 °C pendant 4 minutes. Si nécessaire, l'addition de NaOH fraîchement préparé à une concentration finale de 0,05 M peut faciliter la lyse des cellules. Les échantillons peuvent ensuite être stockés à des températures de -16 °C à -24 °C jusqu'au moment d'être utilisés.
- Appliquer des procédures PCR appropriées pour amplifier les amplimères spécifiques de *C. m. ssp. sepedonicus specific amplicons* (par exemple: Pastrik, 2000; voir l'appendice 4; Li et de Boer, 1995; Mills et al., 1997; Pastrik et Rainey, 1999; Schaad et al., 1999).
- L'identification de *C. m. ssp. sepedonicus* est positive lorsque les amplimères PCR sont de la même taille et présentent les mêmes polymorphismes de longueur des fragments de restriction que pour la souche témoin positive.

9.4 Test FISH

- Préparer une suspension d'environ 10⁶ cellules par millilitre dans de l'eau ultrapure.
- Suivre la procédure du test FISH (voir section 5).
- Le test FISH est positif si l'on obtient les mêmes réactions avec la culture et le témoin positif.

9.5 Test de profil des acides gras (FAP)

- Développer la culture pendant 72 heures à 21 °C (+/- 1 °C) sur gélose de soja Trypticase (Oxoid).
- Appliquer une procédure de test FAP appropriée (Janse, 1991; Stead, 1992).

- c) Pour qu'un test FAP soit positif, le profil de la culture supposée doit être identique à celui du témoin positif. La présence des acides gras caractéristiques 15:1 Anteiso A, 15:0 Iso, 15:0 Anteiso, 16:0 Iso, 16:0 et 17:0 Anteiso est fortement révélatrice de *C. m. sepedonicus*. Des bactéries d'autres genres, comme *Curtobacterium*, *Arthrobacter* et *Micrococcus*, possèdent également certains de ces acides, mais très rarement 15:1 Anteiso A, alors qu'il est présent chez tous les *Clavibacter* spp. à des taux compris entre 1 % et 5 %. Dans le cas de *C. m. sepedonicus*, ce taux gravite habituellement autour de 5 %.

9.6 BOX-PCR

- a) Préparer une suspension d'environ 10^6 cellules par millilitre dans de l'eau ultrapure.
b) Effectuer le test conformément à la procédure (Smith et al., 2001).

10. TEST DE CONFIRMATION

Le test du pouvoir pathogène doit être effectué à la fois pour apporter la confirmation finale d'un diagnostic de *C. m. ssp. sepedonicus* et pour évaluer la virulence des cultures identifiées comme étant *C. m. ssp. sepedonicus*.

- 10.1 Préparer un inoculum d'environ 10^6 cellules/ml à partir d'une culture de trois jours de l'isolat à tester et d'une souche témoin positive appropriée de *C. m. ssp. sepedonicus*.
- 10.2 Inoculer 5 à 10 tiges de jeunes plants d'aubergine au stade de la troisième feuille (voir les sections 7.3 ou 7.4).
- 10.3 Faire incubé entre 18 °C et 24 °C à un degré d'humidité relative élevée, en assurant un arrosage approprié pour prévenir tout engorgement hydrique ou stress de sécheresse (voir la section 7.7). Avec des cultures pures, un flétrissement typique devrait apparaître dans les deux semaines; toutefois, les plants ne présentant pas de symptômes (voir la section 7.8) à l'issue de cette période doivent continuer à incubé jusqu'à trois semaines, à des températures favorables à la croissance des aubergines mais ne dépassant pas 25 °C (voir l'appendice 8). Si la culture ne présente pas de symptômes au bout de trois semaines, on ne peut pas confirmer qu'il s'agit d'une forme pathogène de *C. m. ssp. sepedonicus*.
- 10.4 Assurer l'isolement par rapport aux plants symptomatiques en prélevant une section de tige à une hauteur de 2 cm au-dessus du point d'inoculation. Réduire et mettre en suspension dans un petit volume d'eau distillée stérile ou de tampon phosphaté à 50 mM (voir l'appendice 3). Isoler de la suspension en diluant par étalement simple ou en stries sur MTNA et YPGA (voir l'appendice 5), laisser incubé pendant trois à cinq jours entre 21 °C et 23 °C, puis observer la formation de colonies caractéristiques de *C. m. ssp. sepedonicus*.

APPENDICE 1

Laboratoires pratiquant l'optimisation et la validation des protocoles

Laboratoire ¹	Lieu	Pays
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Vienne et Linz	Autriche
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Belgique
Plantedirektoratet	Lyngby	Danemark
Central Science Laboratory	York	Angleterre
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburgh	Ecosse
Laboratoire national de la protection des végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	France
Laboratoire national de la protection des végétaux, Station de quarantaine de la pomme de terre	Le Rheu	France
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Allemagne
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Allemagne
State Laboratory	Dublin	Irlande
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Pays-Bas
Norwegian Crop Research Institute, Plant Protection Centre	Aas	Norvège
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lisbon	Portugal
Nacionalni institut za biologijo	Ljubljana	Slovénie
Centro Diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	Espagne

¹ Pour les experts de contact, se référer au site web à l'adresse <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

APPENDICE 2

Préparation des témoins positifs et négatifs pour l'application aux cônes des tests de dépistage PCR/IF et FISH

Mettre en culture pendant 72 heures une souche virulente de *C. m. ssp. sepedonicus* [NCPB 4053 ou PD 406] sur un milieu de base MTNA et mettre en suspension dans un tampon phosphaté à 10 mM de manière à obtenir une densité cellulaire d'environ $1 \text{ à } 2 \times 10^8$ ufc par millilitre. Celle-ci correspond généralement à une suspension légèrement turbide présentant une densité optique de 0,20 à 600 nm.

Prélever un cône au talon sur 200 tubercules d'une récolte de variété à peau blanche connue pour être exempte de *R. solanacearum*.

Traiter les talons selon la méthode habituelle et remettre l'extrait concentré en suspension dans 10 millilitres.

Verser 900 µl d'extrait concentré remis en suspension dans dix microtubes stériles de 1,5 ml.

Ensemencer le premier microtube au moyen de 100 µl de la suspension de *C. m. ssp. sepedonicus*. Homogénéiser au vortex.

Etablir des niveaux de contamination au dixième en poursuivant la dilution dans les cinq microtubes suivants.

Les six microtubes contaminés seront utilisés comme témoins positifs. Les quatre microtubes non contaminés seront utilisés comme témoins négatifs. Etiqueter les microtubes en conséquence.

Préparer des aliquotes de 100 µl dans des microtubes stériles de 1,5 ml de manière à obtenir neuf répliques de chaque échantillon témoin. Entreposer entre -16 et -24 °C jusqu'à utilisation.

La présence et la quantification de *C. m. ssp. sepedonicus* dans les échantillons témoins doivent être confirmées en premier lieu par un test d'immunofluorescence.

Pour le test PCR, effectuer une extraction d'ADN à partir des échantillons témoins positifs et négatifs de chaque série d'échantillons.

Pour les tests IF et FISH, effectuer des essais sur les échantillons témoins positifs et négatifs de chaque série d'échantillons.

Dans le cas des tests IF, FISH et PCR, *C. m. ssp. sepedonicus* doit être détecté au minimum dans les témoins positifs à 10^6 et 10^4 cellules/ml et être totalement absent des témoins négatifs.

APPENDICE 3

Tampons pour les procédures de test

GENERALITE: les tampons stérilisés non ouverts peuvent être stockés jusqu'à un an.

1. Tampons pour la procédure d'extraction

1.1 Tampon d'extraction (tampon phosphaté à 50 mM, pH 7,0)

Ce tampon est utilisé pour l'extraction, par homogénéisation ou agitation, de la bactérie présente dans les tissus de la plante.

Na ₂ HPO ₄ (anhydre)	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
Eau distillée	1,00 l

Dissoudre les ingrédients, vérifier le pH et stériliser à l'autoclave pendant 15 minutes à 121 °C.

Les additifs suivants peuvent être utiles:

	Usage	Quantité (par L)
Flocons de Lubrol	Défloculant*	0,5 g
Antimousse au DC silicone	Agent antimoussant*	1,0 ml
Pyrophosphate tétrasodique	Antioxydant	1,0 g
Polyvinyl pyrrolidone-40000 (PVP-40)	Liaison d'inhibiteurs de PCR	50 g

* A utiliser avec la méthode d'extraction par homogénéisation

1.2 Tampon d'extrait concentré (tampon phosphaté à 10 mM, pH 7,2)

Ce tampon est utilisé pour la remise en suspension et la dilution des extraits de talons de tubercules de pommes de terre concentrés par centrifugation.

Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	0,4 g
Eau distillée	1,00 l

Dissoudre les ingrédients, vérifier le pH et stériliser à l'autoclave pendant 15 minutes à 121 °C.

2. Tampons pour le test d'immunofluorescence

2.1 Tampon IF (tampon au phosphate à 10 mM, pH 7,2)

Ce tampon est utilisé pour la dilution des anticorps

Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	0,4 g
NaCl	8,0 g
Eau distillée	1,0 l

Dissoudre les ingrédients, vérifier le pH et stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

2.2 Tampon IF-Tween

Ce tampon est utilisé pour laver les lames.

Ajouter 0,1 % de Tween 20 au tampon IF.

2.3 Glycérol tamponné au phosphate, pH 7,6

Ce tampon est utilisé comme fluide de support sur les fenêtres des lames IF pour renforcer la fluorescence.

Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	3,2 g
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	0,15 g
Glycérol	50 ml
Eau distillée	100 ml

Des solutions supports anti-décoloration sont disponibles dans le commerce: par exemple, Vectashield® (Vector Laboratories) ou Citifluor® (Leica).

APPENDICE 4

Détermination du degré de contamination lors des tests IF et FISH

- Compter le nombre moyen de cellules fluorescentes caractéristiques par champ (c).
- Compter le nombre de cellules fluorescentes caractéristiques par fenêtre de lame de microscope (C).
 $C = c \times S/s$
 où S = la superficie (S) de la fenêtre d'une lame multipuits
 et s = la superficie du champ de l'objectif
 $s = \pi i^2 / 4G^2K^2$ où: i = le coefficient du champ (dépend du type d'oculaire et varie de 8 à 24)
 K = le coefficient du tube (1 ou 1,25)
 G = le grossissement de l'objectif (100 fois, 40 fois, etc.)
- Compter le nombre de cellules fluorescentes caractéristiques par millilitre d'extrait concentré remis en suspension (N)
 $N = C \times 1\,000/y \times F$
 où: y = le volume d'extrait concentré remis en suspension sur chaque fenêtre
 et F = le facteur de dilution de l'extrait concentré remis en suspension.

APPENDICE 5

Milieux d'isolement et de culture de *C. m. ssp. sepedonicus*

a) Milieux de culture de type général

Gélose nutritive

Gélose nutritive (Difco)	23,0 g
Eau distillée	1,0 l

Dissoudre les ingrédients et stériliser à l'autoclave pendant 15 minutes à 121 °C.

Gélose nutritive avec dextrose

Gélose nutritive de Difco Bacto contenant 1 % de D-glucose (monohydrate). Stériliser à l'autoclave à 115 °C pendant 20 minutes.

Gélose avec levure, peptone et glucose (YPGA)

Extrait de levure (Difco)	5,0 g
Bacto-Peptone (Difco)	5,0 g
D-glucose (monohydrate)	10,0 g
Bacto-Agar (Difco)	15,0 g
Eau distillée	1,0 l

Dissoudre les ingrédients et stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

Milieu de culture avec extrait de levure et sels minéraux (YGM)

Extrait de levure bacto (Difco)	2,0 g
D-glucose (monohydrate)	2,5 g
K ₂ HPO ₄	0,25 g
KH ₂ PO ₄	0,25 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,015 g
NaCl	0,05 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,005 g
Bacto-Agar (Difco)	18 g
Eau distillée	1,0 l

Dissoudre les ingrédients et stériliser par demi-litre à l'autoclave pendant 20 minutes à 115 °C.

b) Milieux de croissance sélectifs validés

Milieu MTNA

Sauf mention contraire, tous les ingrédients proviennent de BDH.

Extrait de levure (Difco)	2,0 g
Mannitol	2,5 g
K ₂ HPO ₄	0,25 g
KH ₂ PO ₄	0,25 g
NaCl	0,05 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,015 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,005 g
Gélose (Oxoid n° 1)	16,0 g
Eau distillée	1,0 l

Dissoudre les ingrédients et porter le pH à 7,2. Après un passage à l'autoclave (15 minutes à 121 °C) et un refroidissement à 50 °C, ajouter les antibiotiques: triméthoprime 0,06 g, acide nalidixique 0,002 g, amphotéricine B 0,01 g.

Entreposer les solutions d'antibiotiques comme suit: triméthoprime (Sigma) et acide nalidixique (Sigma) [tous deux à 5 mg/ml] dans du méthanol à 96 %; amphotéricine B (Sigma) [1 mg/ml] dans du diméthylsulfoxyde. Les solutions entreposées sont stérilisées par filtration.

Nota bene: le milieu généraliste se conserve trois mois. Après l'ajout des antibiotiques, il se conserve un mois en atmosphère réfrigérée.

Milieu NCP-88

Gélose nutritive (Difco)	23 g
Extrait de levure (Difco)	2 g
D-Mannitol	5 g
K ₂ HPO ₄	2 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,25 g
Eau distillée	1,0 l

Dissoudre les ingrédients et porter le pH à 7,2. Après passage à l'autoclave et refroidissement à 50 °C, ajouter les antibiotiques suivants: sulfate de polymyxine B (Sigma) 0,003 g, acide nalidixique (Sigma) 0,008 g, cycloheximide (Sigma) 0,2 g.

Dissoudre les antibiotiques en solutions mères: l'acide nalidixique dans du NaOH à 0,01 M; le cycloheximide dans de l'éthanol à 50 %, le sulfate de polymyxine B dans de l'eau distillée. Les solutions entreposées sont stérilisées par filtration.

Nota bene: le milieu généraliste se conserve trois mois. Après l'ajout des antibiotiques, il se conserve un mois en atmosphère réfrigérée.

APPENDICE 6

Protocole et réactifs PCR validés

Nota bene: les tests préliminaires doivent permettre la détection reproductible d'au moins 10^3 à 10^4 cellules de *C. m. sepedonicus* par millilitre d'extrait d'échantillon.

Les tests préliminaires doivent également ne montrer aucun faux résultat positif avec une gamme de souches bactériennes sélectionnées.

1. Protocole PCR multiplex avec contrôle PCR interne (Pastrik et al., 2000)

1.1 Oligonucléotide amorces

Amorce sens PSA-1	5'- ctc ctt gtg ggg tgg gaa aa -3'
Amorce antisens PSA-R	5'- tac tga gat gtt tca ctt ccc c -3'
Amorce sens NS-7-F	5'- gag gca ata aca ggt ctg tga tgc -3'
Amorce antisens NS-8-R	5'- tcc gca ggt tca cct acg ga -3'

Taille de l'amplimère prévue de la matrice d'ADN de *C. m. ssp. sepedonicus* = 502 bp (en présence de l'amorce PSA)

Taille de l'amplimère prévue du contrôle PCR interne 18S rRNA = 377 bp (en présence de l'amorce NS)

1.2 Mélange réactif destiné au PCR

Réactif	Quantité par réaction	Concentration finale
Eau ultrapure stérile	15,725 µl	
Tampon 10X pour PCR ¹ (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1x (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (fraction V) (10 %)	0,25 µl	0,1%
Mélange d-nTP (20 mM)	0,25 µl	0,1 mM
Amorce PSA-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Amorce PSA-R (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Amorce NS-7-F (10 µM) ²	0,1 µl	0,04 µM
Amorce NS-8-R (10 µM) ²	0,1 µl	0,04 µM
Polymérase Taq (5 U/µl) ¹	0,2 µl	1,0 U
Volume de l'échantillon	5,0 µl	
Volume total:		25,0 µl

1 Les méthodes ont été validées en utilisant la polymérase Taq de Perkin Elmer (AmpliTaQ ou Gold) et Gibco BRL.

2 Les concentrations des amorces NS-7-F et NS-8-R ont été optimisées pour l'extraction de noyaux de talons de pommes de terre utilisant la méthode de l'homogénéisation et de la purification de l'ADN suivant Pastrik (2000) [voir sections 6.1.a.) et 6.2]. Une nouvelle optimisation des concentrations de réactifs sera requise si l'extraction par agitation ou d'autres méthodes d'isolement de l'ADN sont utilisées.

1.3 Conditions de la réaction PCR

Exécuter le programme suivant:

- | | | |
|-----------------|-------|--|
| 1 cycle de... | i) | 3 minutes à 95 °C: dénaturation de la matrice ADN; |
| 10 cycles de... | ii) | 1 minute à 95 °C: dénaturation de la matrice ADN; |
| | iii) | 1 minute à 64 °C: hybridation avec les amorces; |
| | iv) | 1 minute à 72 °C: extension de l'ADN complémentaire; |
| 25 cycles de... | v) | 30 secondes à 95 °C: dénaturation de la matrice ADN; |
| | vi) | 30 secondes à 62 °C: hybridation avec les amorces; |
| | vii) | 1 minute à 72 °C: extension de l'ADN complémentaire; |
| 1 cycle de... | viii) | 5 minutes à 72 °C: extension finale; |
| | ix) | maintenir à 4 °C. |

Nota bene: ce programme a été optimisé pour une utilisation avec un cycleur thermique MJ Research PTC 200. Une modification de la durée des étapes des cycles ii), iii), iv), v), vi) et vii) peut être nécessaire pour une utilisation avec d'autres modèles.

1.4 Analyse de restriction enzymatique de l'amplimère

Les produits PCR amplifiés de l'ADN de *C. m. ssp. sepedonicus* produisent un polymorphisme de longueur de fragments de restriction distinct avec l'enzyme *Bgl* II après incubation à 37 °C pendant 30 minutes. Les fragments de restriction obtenus à partir du fragment spécifique de *C. m. ssp. sepedonicus* ont une longueur de 282 bp et 220 bp.

2. Préparation du tampon de lest

2.1 Bleu de bromophénol (solution concentrée à 10 %)

Bleu de bromophénol	5 g
Eau distillée (bidest)	50 ml

2.2 Tampon de lest

Glycérol (86 %)	3,5 ml
Bleu de bromophénol (5.1)	300 µl
Eau distillée (bidest)	6,2 ml

3. 10X tampon d'EDTA (TAE) tris-acétate, pH 8,0

Tampon tris	48,4 g
Acide acétique glacial	11,42 ml
EDTA (sel disodique)	3,72 g
Eau distillée	1,00 l

Diluer jusqu'à 1 x avant utilisation.

Egalement disponible dans le commerce (ex.: Invitrogen ou équivalent)

APPENDICE 7

Réactifs validés pour le test FISH

Oligosondes

Sonde CMS-CY3-01 spécifique de *Cms*: 5'- ttg cgg ggc gca cat ctc tgc acg-3'

Sonde eubactérienne EUB-338-FITC non spécifique: 5'- gct gcc tcc cgt agg agt-3'

Solution de fixation

[ATTENTION! LE FIXATIF CONTIENT DU PARAFORMALDEHYDE, QUI EST TOXIQUE. PORTER DES GANTS ET NE PAS INHALER. IL EST CONSEILLÉ DE TRAVAILLER SOUS UNE HOTTE DE CHIMISTE.]

- i) Chauffer 9 ml d'eau pure moléculaire (ex: eau ultrapure à environ 60 °C et ajouter 0,4 g de paraformaldéhyde. Le paraformaldéhyde est dissous après avoir ajouté 5 gouttes de 1N NaOH et remué avec un agitateur magnétique.
- ii) Ajuster le pH à 7,0 par l'ajout de 1ml de tampon phosphaté à 0,1,1M (PB; pH 7,0) et 5 gouttes de 1N HCl. Vérifier le pH avec les bandes indicatrices et ajuster en cas de besoin avec du HCl ou NaOH. [ATTENTION! NE PAS UTILISER DE PH-METRE DANS LES SOLUTIONS CONTENANT DU PARAFORMALDEHYDE.]
- iii) Filtrer la solution à travers un filtre à membrane de 0,22 µm et protéger de la poussière à 4 °C jusqu'à l'utilisation.
- iv) *Nota bene: solution de fixation de remplacement: éthanol à 96 %.*

Hybmix 3X

NaCl	2,7 M
Tris-HCl	60 mM (pH 7,4)
EDTA (filtre stérilisé et passé à l'autoclave)	15 mM
Diluer jusqu'à 1 x comme requis.	

Solution d'hybridation

Hybmix 1X	
Dodécylsulfate de sodium (SDS)	0,01%
Sonde EUB 338	5 ng/µl
Sonde CMSCY301	5 ng/µl

Préparer des quantités de solution d'hybridation suivant les calculs du tableau 1. Pour chaque lame (contenant 2 échantillons différents en double), 90 µl de solution d'hybridation sont nécessaires.

Tableau 1: Quantités suggérées pour préparer le mélange d'hybridation.

Nombre de lames:	2	8
Eau ultrapure stérile	50,1	200,4
hybmix 3x	30,0	120,0
1 % de Dodécylsulfate de sodium	0,9	3,6
Sonde EUB 338 (100 ng/µl)	4,5	18,0
Sonde CMSCY301 (100 ng/µl)	4,5	18,0
Volume total (µl)	90,0	360,0

N.B. Stocker dans l'obscurité et à -20 °C toutes les solutions contenant des oligosondes sensibles à la lumière. Protéger de la lumière directe du soleil ou de la lumière électrique directe au cours de l'utilisation.

5. **Tampon M phosphaté 0,1, pH 7,0**

Na ₂ HPO ₄	8,52 g
KH ₂ PO ₄	5,44 g
Eau distillée	1,00 l

Dissoudre les ingrédients, vérifier le pH et stériliser à l'autoclave pendant 15 minutes à 121 °C.

APPENDICE 8

Cultures d'aubergine

Semer des graines d'aubergines (*Solanum melongena*) dans une terre de semis pasteurisée. Repiquer les plantules dans de la terre de rempotage pasteurisée lorsque les cotylédons sont entièrement développés (10 à 14 jours).

Les aubergines doivent être cultivées en serre dans les conditions suivantes:

Durée du jour:	14 heures ou durée naturelle de la journée si elle est supérieure,
Température: jour:	21 à 24 °C,
nuit:	15 °C.

Variétés sensibles d'aubergine: «Black Beauty»,
«Long Tom»,
«Rima»,
«Balsas».

Fournisseur: voir site web à l'adresse <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

APPENDICE 9

Procédure pour la réaction de Gram [modification de Hucker] (Doetsch, 1981)*

Solution de violet cristallisé

Dissoudre 2 g de violet cristallisé dans 20 ml d'éthanol à 95 %.

Dissoudre 0,8 g d'oxalate d'ammonium dans 80 ml d'eau distillée.

Mélanger les deux solutions.

Soluté iodo-ioduré de Lugol

Iode	1 g
Iodure de potassium	2 g
Eau distillée	300 ml

Broyer les solides ensemble à l'aide d'un pilon et d'un mortier. Ajouter à l'eau et mélanger dans un récipient fermé pour dissolution.

* Il est également possible d'utiliser des kits de coloration et des solutés disponibles dans le commerce.

Solution colorante de safranine

Solution mère:

Safranine O	2,5 g
Ethanol à 95 %	100 ml

Mélanger et stocker.

Diluer à 1:10 pour obtenir une solution de travail.

Procédure de coloration

1. Préparer les frottis, les sécher à l'air et les fixer à la chaleur.
2. Plonger la lame dans la solution de cristal violet pendant une minute.
3. Laver rapidement à l'eau courante.
4. Plonger dans le soluté iodo-ioduré de Lugol pendant une minute.
5. Laver à l'eau courante et sécher au buvard.
6. Décolorer en ajoutant goutte à goutte de l'éthanol à 95 % jusqu'à ce qu'il ne modifie plus la couleur ou en plongeant dans l'éthanol pendant 30 secondes tout en agitant légèrement.
7. Laver à l'eau courante et sécher au buvard.
8. Plonger dans la solution de safranine pendant 10 secondes.
9. Laver à l'eau courante et sécher au buvard.

Les bactéries Gram positives ont une couleur violet-bleu; les bactéries Gram négatives ont une couleur rose-rouge.

REFERENCES

1. Anonyme, 1987. Scheme of the detection and diagnosis of the ring rot bacterium *Corynebacterium sepedonicum* in batches of potato tubers. Commission des Communautés européennes, Luxembourg. Publ EUR 11288 EN, 21 pp.
2. Bradbury, J. F., 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. Rev. Pl. Path., 49, 213-218.
3. Dinesen, I. G., 1984. The extraction and diagnosis of *Corynebacterium sepedonicum* from diseased potato tubers. EPPO Bull. 14 (2), 147-152.
4. Doetsch, R. N., 1981. Determinative methods of light microscopy. In: Manual of methods for general bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, 21-23.
5. Hugh, R. and Leifson, F., 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. J. Bact., 66, 24-26.
6. Janse, J. D., 1991. Infra- and intra-specific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty-acid analysis. Systematic and Applied Microbiology 14; 335-345.
7. Janse, J. D. and J. Van Vaerenbergh. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (*Corynebacterium sepedonicum*) in potato. EPPO Bull., N° 17, 1987, pp. 1-10.
8. Jansing, H. and K. Rudolph, 1998. Physiological capabilities of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* and development of a semi-selective medium. Journal of Plant Diseases and Protection, 105, 590-601.
9. Kovacs, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature, Lond., 178, 703.
10. Klement Z.; Rudolph, K and D. C. Sands, 1990. Methods in Phytobacteriology. Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 pp.
11. Lelliott, R. A., 1966. The plant pathogenic coryneform bacteria. J. appl. Bact., 29, 114-118.
12. Lelliott, R. A., E. Billing and A. C. Hayward, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads J. appl. Bact., 29, 470-489.
13. Lelliott, R. A. and P. W., Sellar, 1976. The detection of latent ring rot (*Corynebacterium sepedonicum* (Spiek. et Kotth.) Skapt. et Burkh.) in potato stocks. EPPO Bull., 6 (2), 101-106.
14. Li, X. and S.H. de Boer, 1995. Selection of Polymerase Chain Reaction primers from RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Phytopathology, 85, 837-842.
15. Mills, D., Russell, B., W. and J., W. Hanus, 1997. Specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* by amplification of three unique DNA sequences isolated by subtraction hybridization. Phytopathology, 87, 8, 853-861.
16. Pstrik, K.-H. and R.A. Rainey. 1999. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. J. Phytopathology 147; 687-693.
17. Pstrik, K.-H., 2000. Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. European Journal of Plant Pathology, 106, 155-165.

18. Ramamurthi, C. S., 1959. Comparative studies on some Gram-positive phytopathogenic bacteria and their relationship to the *Corynebacteria*. Mem. Cornell agric. Exp. Sta., 366, 52 pp.
19. Schaad, W., Berthier-Schaad, Y., Sechler, A. and Knorr, D. (1999) Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system. Plant Disease 83; 1095-1100.
20. Schaad, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Schaad [Hrsg.]. - 3. ed.; St. Paul, Minnesota, 373 pp.
21. Skerman, V. B. D., 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria. 2nd ed., William and Wilkins Company, Baltimore.
22. Smith, N. C.; Hennesy, J; Stead, D.E., 2001. Repetitive sequence-derived PCR profiling using the BOX-A1 *Ralstonia solanacearum* primer for rapid identification of plant pathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. European Journal of Plant Pathology, 107 (7), 739-748.
23. Sneath, P. H. A. and V. G. Collins, 1974. A study in test reproductibility between laboratories: report of *Pseudomonas* working party. Antonie van Leeuwenhoek, 40, 481-527.
24. Stead, D.E. 1992. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty-acid profiles. International Journal of Systematic Bacteriology 42; 281-295.
25. Wullings, B. A.; van Beuningen, A. R.; Janse, J. D. and A. D. L. Akkermans, 1998. Detection of *Ralstonia solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent *in situ* hybridization with 23s rRNA-targeted probes. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4546-4554.

ANNEXE II

1. Dans tous les cas d'apparition suspectée pour laquelle on a constaté, lors du ou des tests de dépistage pratiqués selon les méthodes décrites à l'annexe I, une réaction positive devant être confirmée ou infirmée par l'application de ces procédures, il convient de garder et de conserver dans des conditions appropriées:
 - tous les tubercules faisant partie de l'échantillon et, dans la mesure du possible, tous les plants faisant partie de l'échantillon,
 - tout extrait résiduel et matériel supplémentaire préparé pour le ou les tests de dépistage, tels que les lames préparées en vue de tests d'immunofluorescence,
 et
 - toute documentation pertinente,
 jusqu'au terme desdites procédures.
 La conservation des tubercules permettra de tester les variétés, le cas échéant.
2. En cas de confirmation de la présence de l'organisme, il convient de garder et de conserver dans des conditions appropriées:
 - le matériel visé au point 1,
 - un échantillon d'aubergine infecté par l'inoculation d'extrait de tubercule ou de plante,
 - la culture isolée de l'organisme,
 et ce pendant au moins un mois après la procédure de notification prévue à l'article 5, paragraphe 2.

ANNEXE III

1. Pour déterminer l'étendue de la contamination probable visée à l'article 5, paragraphe 1, point b), il convient de prendre en considération les éléments suivants:
 - les tubercules ou les plants cultivés en un lieu de production déclaré contaminé en vertu de l'article 5, paragraphe 1, point a),
 - le(s) lieu(x) de production ayant, dans le système de production, un lien avec les tubercules ou les plants qui ont été déclarés contaminés en vertu de l'article 5, paragraphe 1, point a), y compris ceux partageant l'équipement et les installations de production directement ou par le biais d'un entrepreneur commun,
 - les tubercules ou les plants produits dans le(s) lieu(x) de production visé(s) au tiret précédent, ou présents dans ledit (lesdits) lieu(x) pendant la période où les tubercules ou plants déclarés contaminés en vertu de l'article 5, paragraphe 1, point a), étaient présents dans les lieux de production visés au premier tiret,
 - les installations où sont manipulées des pommes de terre provenant des lieux de production susvisés,
 - tout matériel, véhicule, récipient, entrepôt ou partie de ceux-ci, ainsi que tout autre objet, y compris l'emballage, qui peut avoir été en contact avec les tubercules ou les plants déclarés contaminés conformément à l'article 5, paragraphe 1, point a) ii),

- tout tubercule ou plante entreposé dans ou en contact avec un des éléments ou objets visés au tiret précédent, avant le nettoyage et la désinfection de ceux-ci,
 - à la suite des tests visés à l'article 6, les tubercules ou plants ayant un lien clonal ou parental, avec les tubercules ou les plants déclarés contaminés conformément à l'article 5, paragraphe 1, point a) ii), et pour lesquels, bien que les résultats des tests concernant la présence de l'organisme aient été négatifs, il apparaît que la contamination est probable par le biais d'un lien clonal. Un test sur les variétés peut être opéré afin de vérifier l'identité des tubercules ou plants contaminés possédant un tel lien clonal, et
 - le(s) lieu(x) de production des tubercules ou plants visés au tiret précédent.
2. Pour déterminer la propagation possible visée à l'article 5, paragraphe 1, point c), il convient de prendre en considération les éléments suivants:
- la proximité des autres lieux de production où sont cultivées des pommes de terre ou d'autres plantes hôtes,
 - la production et l'utilisation communes des stocks de pommes de terre de semence.
3. La notification visée à l'article 5, paragraphe 2, premier alinéa, comprend:
- immédiatement après la confirmation de la présence de l'organisme par tests de laboratoire, suivant les méthodes prévues à l'annexe I, au minimum:
 - la dénomination variétale du lot de pommes de terre,
 - le type (conservation, semences, etc.) et, le cas échéant, la catégorie de semences de pomme de terre;
 - lorsqu'il existe un risque de contamination de pommes de terre en provenance ou à destination d'un ou plusieurs des autres Etats membres, l'Etat membre dans lequel le foyer a été confirmé communique immédiatement à l'Etat membre ou aux Etats membres concernés les informations permettant de se conformer à l'article 5, paragraphe 3, à savoir:
 - la dénomination variétale du lot de pommes de terre,
 - les nom et adresse de l'expéditeur et du destinataire,
 - la date de livraison du lot de pommes de terre,
 - le volume du lot de pommes de terre livré,
 - le cas échéant, une copie du passeport phytosanitaire ou au moins le numéro du passeport phytosanitaire, ainsi que, le cas échéant, le numéro d'enregistrement du producteur ou du négociant et une copie du bon de livraison.
- La Commission est informée immédiatement de la communication de ces informations:
- après l'achèvement de toutes les investigations, pour chaque cas:
 - la date à laquelle la contamination a été confirmée,
 - une brève description des investigations menées afin d'identifier la source et la propagation possible de la contamination, en précisant le niveau d'échantillonnage appliqué,
 - des informations sur la ou les sources identifiées ou présumées de la contamination,
 - des précisions sur l'étendue de la contamination déclarée, y compris le nombre de lieux de production et le nombre de lots, avec indication de la variété et, s'il s'agit de pommes de terre de semence, de la catégorie,
 - des précisions sur la délimitation de la zone, y compris le nombre de lieux de production non déclarés comme contaminés mais inclus dans la zone,
 - toutes les autres informations que la Commission pourrait souhaiter en ce qui concerne le ou les foyers déclarés.

ANNEXE IV

1. Les mesures sous contrôle officiel visées à l'article 7, paragraphe 1, sont les suivantes:
- l'utilisation comme aliment destiné aux animaux après un traitement thermique de nature à éliminer tout risque de survie de l'organisme pathogène, ou
 - la décharge dans un centre d'élimination des déchets officiellement agréé ne présentant aucun risque identifiable de propagation du pathogène dans l'environnement au travers, par exemple, d'infiltrations dans des terres agricoles, ou
 - l'incinération, ou
 - la transformation industrielle par livraison directe et immédiate à une entreprise de transformation disposant d'installations officiellement agréées d'élimination des déchets dont il a été établi qu'elles ne présentaient aucun risque identifiable de propagation de l'organisme, ainsi que d'un système permettant de nettoyer et de désinfecter au moins les véhicules quittant l'entreprise, ou

- d'autres mesures, pour autant qu'il soit établi qu'elles ne présentent aucun risque identifiable de propagation de l'organisme, ces mesures et leur justification devant par ailleurs être notifiées à la Commission et aux autres Etats membres.

Tout déchet qui subsisterait au terme des opérations visées ci-dessus ou qui en résulterait est éliminé selon des méthodes officiellement agréées conformément à l'annexe V de la présente directive.

2. L'utilisation ou l'élimination appropriée des tubercules ou plants déclarés probablement contaminés en vertu de l'article 5, paragraphe 1, point b), et visés à l'article 7, paragraphe 2, sous le contrôle des organismes officiels compétents des Etats membres concernés et moyennant une communication adéquate entre les organismes officiels compétents de manière à garantir ce contrôle à tout moment ainsi que l'agrément des organismes officiels compétents de l'Etat membre où les pommes de terre doivent être conditionnées ou transformées quant aux installations d'élimination des déchets visées aux premier et deuxième tirets, impliquent:
 - leur utilisation en tant que pommes de terre de conservation destinées à la consommation, en emballages prévus pour une livraison et une utilisation directes ne nécessitant aucun réemballage, dans un site disposant d'installations appropriées d'élimination des déchets. Les pommes de terre destinées à la plantation ne peuvent être manipulées sur le même site que si cela se fait d'une manière séparée ou après nettoyage et désinfection, ou
 - leur utilisation en tant que pommes de terre de conservation destinées à la transformation industrielle après livraison directe et immédiate à une entreprise de transformation disposant d'installations appropriées d'élimination des déchets ainsi que d'un système permettant de nettoyer et de désinfecter au moins les véhicules quittant l'entreprise, ou
 - une autre utilisation ou élimination, pour autant qu'il soit établi qu'il n'y a aucun risque identifiable de propagation de l'organisme et sous réserve de l'agrément desdits organismes officiels compétents.
3. Les méthodes appropriées de nettoyage et de désinfection des objets visés à l'article 7, paragraphe 3, sont celles dont il a été établi qu'elles ne présentaient aucun risque identifiable de propagation de l'organisme; elles sont appliquées sous la surveillance du service.
4. Les mesures à mettre en œuvre par le service dans la zone délimitée établie en vertu de l'article 5, paragraphe 1, point c), et visées à l'article 7, paragraphe 4, comprennent les mesures suivantes:
 - 4.1. sur les lieux de production déclarés contaminés en vertu de l'article 5, paragraphe 1, point a):
 - a) dans un champ déclaré contaminé en vertu de l'article 5, paragraphe 1, point a):
 - i) – pendant au moins les trois campagnes suivant la campagne de la contamination déclarée:
 - des mesures sont prises en vue d'éliminer les repousses de pommes de terre et les autres plantes hôtes de l'organisme;
 - aucun tubercule, plant ou graine de pommes de terre, aucune autre plante hôte de l'organisme et aucune culture pour laquelle il existe un risque identifié de propagation de l'organisme n'est planté ni semé;
 - durant la première campagne de récolte des pommes de terre suivant la période indiquée au tiret précédent et à la condition que le champ ait été déclaré exempt de repousses de pommes de terre et d'autres plantes hôtes de l'organisme pendant au moins les deux campagnes consécutives précédant la plantation, seule la production de pommes de terre de conservation sera autorisée et les tubercules récoltés seront testés suivant la procédure détaillée à l'annexe I;
 - durant la saison de récolte des pommes de terre suivant celle visée au tiret précédent et après un cycle approprié de rotation, qui est de deux ans dans le cas des cultures de plants de pommes de terre, il est autorisé de planter des pommes de terre pour la production de semences ou de pommes de terre de conservation et des recherches officielles sont effectuées conformément à l'article 2, paragraphe 1, ou
 - ii) – pendant les quatre campagnes suivant celle de la contamination déclarée:
 - des mesures sont prises en vue d'éliminer les repousses de pommes de terre et les autres plantes hôtes de l'organisme spontanément présentes,
 - le champ est mis et maintenu soit en jachère nue, soit en pâturage permanent, auquel cas il est fréquemment fauché ras ou mis en pâturage intensif,
 - durant la première campagne de récolte des pommes de terre suivant la période indiquée au tiret précédent et à la condition que le champ ait été déclaré exempt de repousses de pommes de terre et d'autres plantes hôtes de l'organisme pendant au moins les deux campagnes consécutives précédant la plantation, la production de semences ou de pommes de terre de conservation sera autorisée et les tubercules récoltés seront testés suivant la procédure détaillée à l'annexe I;
 - b) dans tous les autres champs du lieu de production contaminé, et à la condition que les organismes officiels compétents acquièrent la certitude que le risque constitué par les repousses de pommes de terre et les autres plantes hôtes de l'organisme naturellement présentes a été éliminé:
 - au cours de la campagne suivant celle de la contamination déclarée, soit il n'est planté ni semé aucun tubercule, plant ou semence véritable de pomme de terre ni aucune autre plante hôte de l'organisme naturellement présente,

- soit il peut être planté des plants de pommes de terre officiellement certifiés, exclusivement en vue de la production de pommes de terre de conservation,
 - au cours de la deuxième campagne suivant celle de la contamination déclarée, seules des semences certifiées ou des plants de pommes de terre ayant fait l'objet d'un dépistage officiel du flétrissement bactérien et cultivés sous contrôle officiel dans des lieux de production autres que ceux visés au point 4.1 sont plantés en vue de la production de semences ou de pommes de terre de conservation,
 - pendant au moins la troisième campagne suivant la contamination déclarée, seuls des plants de pommes de terre certifiés ou des plants de pommes de terre cultivés sous contrôle officiel à partir de plants de pommes de terre certifiés sont plantés en vue de la production de pommes de terre de semence ou de conservation,
 - au cours de chacune des campagnes visées aux points précédents, des mesures sont prises pour éliminer les repousses de pommes de terre ainsi, le cas échéant, que les plantes hôtes de l'organisme spontanément présentes et, dans chaque champ de pommes de terre, des tests officiels des pommes de terre récoltées sont effectués conformément à la procédure détaillée à l'annexe I;
 - c) immédiatement après la déclaration de contamination conformément à l'article 5, paragraphe 1, point a), et après la première campagne suivante, tout le matériel et les installations de stockage présents sur le lieu de production et impliqués dans la production de pommes de terre sont nettoyés et désinfectés en tant que de besoin par des méthodes appropriées, conformément au point 3;
 - d) dans une unité de production en culture protégée permettant le remplacement total du milieu de culture,
 - aucun tubercule, plant ou graine n'est planté ni semé, sauf si l'unité de production a été soumise à des mesures sous contrôle officiel visant à l'élimination de l'organisme et de toute plante hôte, y compris au moins le remplacement complet du milieu de culture ainsi que le nettoyage et la désinfection de l'unité de production et de tout l'équipement, et si elle a par la suite été agréée pour la production de pommes de terre par les organismes officiels responsables,
 - la production de pommes de terre est issue de plants de pomme de terre certifiés, de minitubercules ou de microplants provenant de sources testées.
- 4.2. A l'intérieur de la zone délimitée, sans préjudice des mesures énumérées au point 4.1, le service:
- a) immédiatement après la déclaration de la contamination, exige que toutes les machines et installations de stockage situées sur le lieu de production soient nettoyées et, si nécessaire, désinfectées selon les méthodes appropriées précisées au point 3;
 - b) immédiatement après la déclaration de la contamination et pendant au moins trois périodes de végétation:
 - fait surveiller par leurs organismes officiels responsables les installations pratiquant la culture, le stockage et la manutention de tubercules de pommes de terre, ainsi que les locaux des entreprises exploitant sous contrat du matériel utilisé dans le secteur de la pomme de terre,
 - exige que seules des semences certifiées ou des semences cultivées sous contrôle officiel soient plantées pour toutes les cultures de pommes de terre dans ladite zone, et que soient soumises à des tests les pommes de terre de semence récoltées sur des lieux de production déclarés probablement contaminés en vertu de l'article 5, paragraphe 1, point b),
 - exige, dans toutes les installations de la zone, la manutention séparée des stocks de plants de pomme de terre récoltés et des stocks de pommes de terre de conservation, ou la mise en œuvre d'un système de nettoyage et de désinfection entre la manutention des plants de pommes de terre et des pommes de terre de conservation,
 - procède à des recherches officielles conformément à l'article 2, paragraphe 1;
 - c) établit, en tant que de besoin, un programme de remplacement de tous les stocks de plants de pommes de terre sur une période appropriée.

ANNEXE V

Afin de prévenir tout risque identifiable de propagation de l'organisme, les installations d'élimination des déchets officiellement agréées et visées à l'annexe IV, point 1, respectent les dispositions ci-après.

- i) Les déchets de pommes de terre (y compris les pommes de terre déclassées et les pelures) et tout autre déchet solide lié aux pommes de terre (y compris la terre, les pierres et d'autres débris) sont éliminés:
 - dans un centre d'élimination des déchets officiellement agréé ne présentant aucun risque identifiable de propagation de l'organisme pathogène dans l'environnement au travers, par exemple, d'infiltrations dans des terres agricoles, les déchets étant acheminés directement vers le site dans des conditions d'isolement prévenant tout risque de perte, ou
 - par incinération, ou

- au travers d'autres mesures, pour autant qu'il soit établi qu'elles ne présentent aucun risque identifiable de propagation de l'organisme. Ces mesures doivent être notifiées à la Commission et aux autres Etats membres.
- ii) Effluents liquides: avant leur élimination, les effluents liquides contenant des solides en suspension sont soumis à un procédé de filtration ou de décantation afin d'en extraire ces solides. Ces derniers sont éliminés ainsi qu'il est précisé au point i).

Les effluents liquides sont ensuite:

- soit chauffés à cœur à une température de 60 °C pendant au moins 30 minutes avant d'être éliminés,
- soit éliminés d'une autre manière, sous réserve d'agrément officiel et sous contrôle officiel, de telle sorte qu'il n'y ait aucun risque identifiable de contact des déchets avec des terres agricoles. Les modalités en sont notifiées aux autres Etats membres ainsi qu'à la Commission.

Les différentes procédures décrites dans la présente annexe s'appliquent également aux déchets liés à la manipulation, à l'élimination et au traitement des lots contaminés.
