

MEMORIAL
Journal Officiel
du Grand-Duché de
Luxembourg



MEMORIAL
Amtsblatt
des Großherzogtums
Luxemburg

RECUEIL DE LEGISLATION

A — N° 157

23 août 2007

S o m m a i r e

LUTTE CONTRE RALSTONIA SOLANACEARUM (SMITH) YABUUCHI ET AL.

Règlement grand-ducal du 1^{er} août 2007 modifiant le règlement grand-ducal du 27 octobre 2000
concernant la lutte contre *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. page **2878**

Règlement grand-ducal du 1^{er} août 2007 modifiant le règlement grand-ducal du 27 octobre 2000 concernant la lutte contre *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.

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 98/57/CE du Conseil du 20 juillet 1998 concernant la lutte contre *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. telle que modifiée en dernier lieu par la directive 2006/63/CE de la Commission du 14 juillet 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 II à VII du règlement grand-ducal du 27 octobre 2000 concernant la lutte contre *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. 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. 2006/63/CE

ANNEXE II

PROCEDURE DE TEST POUR DIAGNOSTIQUER, DETECTER ET IDENTIFIER *RALSTONIA SOLANACEARUM* (SMITH) YABUUCHI ET AL.

DOMAINE D'APPLICATION DE LA PROCEDURE

La procédure présentée ci-dessous décrit les différentes étapes à suivre pour:

- i) diagnostiquer le flétrissement bactérien sur les tubercules de pomme de terre et sur les plantes de pomme de terre et de tomate et quelques autres plantes hôtes;
- ii) détecter *Ralstonia solanacearum* dans des échantillons de tubercules de pomme de terre, de plants de pommes de terre, de tomates et d'autres hôtes, dans l'eau ou dans le sol;
- iii) identifier *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*).

TABLE DES MATIERES

	Principes généraux
SECTION I:	Application de la procédure de test
1.	Procédure de détection pour diagnostiquer le flétrissement bactérien (<i>R. solanacearum</i>) sur les tubercules de pomme de terre et sur les plantes de pomme de terre et de tomates ou d'autres plantes hôtes présentant des symptômes de flétrissement bactérien
2.	Procédure pour détecter et identifier <i>R. solanacearum</i> sur des échantillons de tubercules de pomme de terre asymptomatiques
3.	Procédure pour détecter et identifier <i>R. solanacearum</i> sur des échantillons de plantes de pomme de terre et de tomate ou d'autres plantes hôtes asymptomatiques

- SECTION II: Méthodes détaillées pour détecter *R. solanacearum* sur les tubercules de pomme de terre, les plantes de pomme de terre et de tomate ou d'autres plantes hôtes présentant des symptômes de flétrissement bactérien
1. Symptômes
 2. Tests rapides de dépistage
 3. Procédure d'isolement
 4. Tests d'identification de *R. solanacearum*
- SECTION III: 1. Méthodes détaillées pour détecter et identifier *R. solanacearum* sur des échantillons de tubercules de pomme de terre asymptomatiques
- 1.1. Préparation de l'échantillon
 - 1.2. Tests
2. Méthodes détaillées pour détecter et identifier *R. solanacearum* sur des échantillons de plantes de pomme de terre et de tomate ou d'autres plantes asymptomatiques
- 2.1. Préparation de l'échantillon
 - 2.2. Tests
- SECTION IV: 1. Procédure pour détecter et identifier *R. solanacearum* dans l'eau
2. Méthodes pour détecter et identifier *R. solanacearum* dans l'eau
- 2.1. Préparation de l'échantillon
 - 2.2. Tests
- SECTION V: 1. Procédure pour détecter et identifier *R. solanacearum* dans le sol
2. Méthodes pour détecter et identifier *R. solanacearum* dans le sol
- 2.1. Préparation des échantillons
 - 2.2. Tests
- SECTION VI: Protocoles optimisés pour détecter et identifier *R. solanacearum*
- (A) Diagnostic et tests de détection
1. Test d'exsudation des tiges
 2. Mise en évidence des granules de poly-β-hydroxybutyrate (PHB)
 3. Tests de séro-agglutination
 4. Isolement sélectif
 - 4.1. Etalement sur milieu sélectif
 - 4.2. Procédure d'enrichissement
 5. Test d'immunofluorescence (Test IF)
 6. Test de réaction en chaîne par polymérase (Test PCR)
 - 6.1. Méthodes de purification de l'ADN
 - 6.1. a) Méthode de Pstrik (2000)
 - 6.1. b) Autres méthodes
 - 6.2. PCR
 7. Test FISH
 8. Tests ELISA
 8. a) ELISA indirect
 8. b) DAS-ELISA
 9. Test biologique
- (B) Tests d'identification
1. Tests d'identification nutritionnel et enzymatique
 2. Test IF
 3. Test ELISA
 4. Test PCR
 5. Test FISH

6. Test de profil des acides gras (FAP)
7. Méthodes de caractérisation de la souche
 - 7.1. Détermination du biovar
 - 7.2. Empreinte génomique
 - 7.3. Méthodes PCR

(C) Test de confirmation

- Appendice 1 Laboratoires pratiquant l'optimisation et la validation des protocoles
- Appendice 2 Milieux d'isolement et de culture de *R. solanacearum*
- Appendice 3 (A) Matériel de contrôle normalisé disponible dans le commerce
(B) Préparation des contrôles
- Appendice 4 Tampons pour les procédures de test
- Appendice 5 Détermination du degré de contamination lors des tests IF et FISH
- Appendice 6 Protocoles PCR et réactifs validés
- Appendice 7 Réactifs validés pour le test FISH
- Appendice 8 Conditions de culture pour les tomates et les aubergines
- Références

PRINCIPES GENERAUX

Les protocoles optimisés pour les différentes méthodes, les réactifs validés et les détails 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 *R. solanacearum* en tant que matériels de contrôle, il sera nécessaire de mettre en œuvre les procédures dans des conditions de quarantaine appropriées prévoyant des installations adéquates d'élimination des déchets et dans les conditions des licences appropriées délivrées par les autorités officielles de quarantaine.

Les paramètres des tests doivent garantir une détection cohérente et reproductible des niveaux de *R. solanacearum* aux seuils fixés par 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 l'étalonnage des équipements, la manipulation et la conservation soigneuses des réactifs et toutes les mesures visant à empêcher la contamination entre échantillons, par exemple la séparation des témoins positifs et des échantillons des tests. Des normes de contrôle de la qualité doivent être appliquées pour éviter des erreurs administratives et autres, notamment en ce qui concerne l'étiquetage et la documentation.

L'apparition suspectée au sens de l'article 4, paragraphe 2, de la directive 98/57/CE implique un résultat positif des tests de diagnostic ou de dépistage réalisés sur un échantillon comme précisé dans les diagrammes fonctionnels ci-après. Un premier test de dépistage positif (test IF, PCR/FISH, isolement sélectif) doit être confirmé par un deuxième test de dépistage basé sur un autre principe biologique.

Si le premier test de dépistage est positif, la contamination par *R. solanacearum* est suspectée et un deuxième test de dépistage doit être réalisé. Si le deuxième test de dépistage est positif, la suspicion est confirmée (apparition suspectée) et les tests suivant la procédure doivent être poursuivis. Si le deuxième test de dépistage est négatif, l'échantillon est considéré comme non contaminé par *R. solanacearum*.

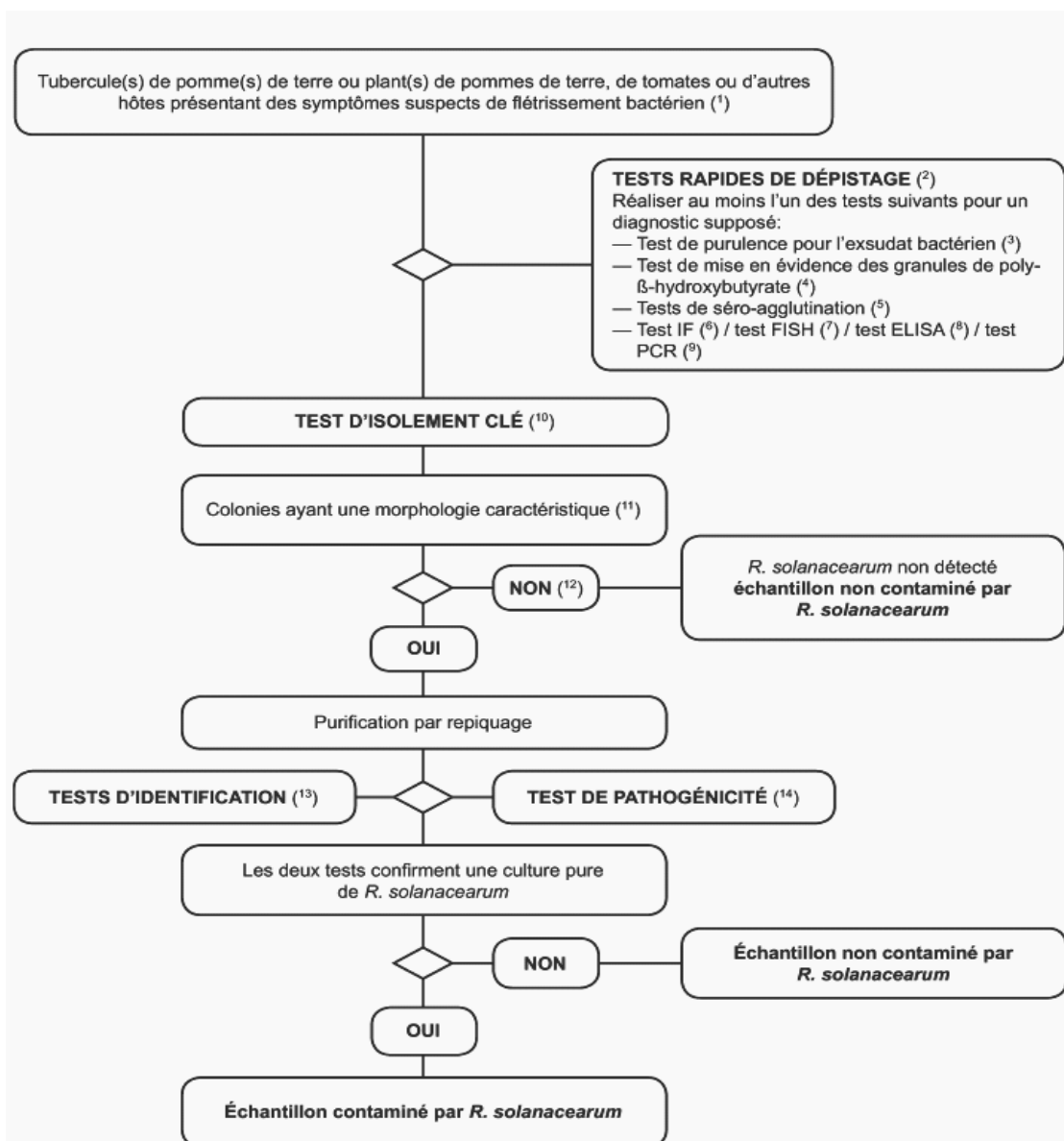
La présence confirmée visée à l'article 5, paragraphe 1, de la directive 98/57/CE implique l'isolement et l'identification d'une culture pure de *R. solanacearum* avec confirmation de la pathogénicité.

SECTION I

APPLICATION DE LA PROCEDURE DE TEST

1. Procédure de détection pour diagnostiquer le flétrissement bactérien (*Ralstonia solanacearum*) sur les tubercules de pomme de terre et sur les plantes de pomme de terre et de tomate ou d'autres plantes hôtes présentant des symptômes de flétrissement bactérien.

La procédure de test concerne les tubercules de pomme de terre et les plantes présentant des symptômes typiques du flétrissement bactérien ou permettant de soupçonner sa présence. Elle comporte un test rapide de dépistage, l'isolement de l'agent pathogène à partir du tissu vasculaire infecté sur un milieu (sélectif) et, en cas de résultat positif, l'identification de la culture comme étant *Ralstonia solanacearum*.



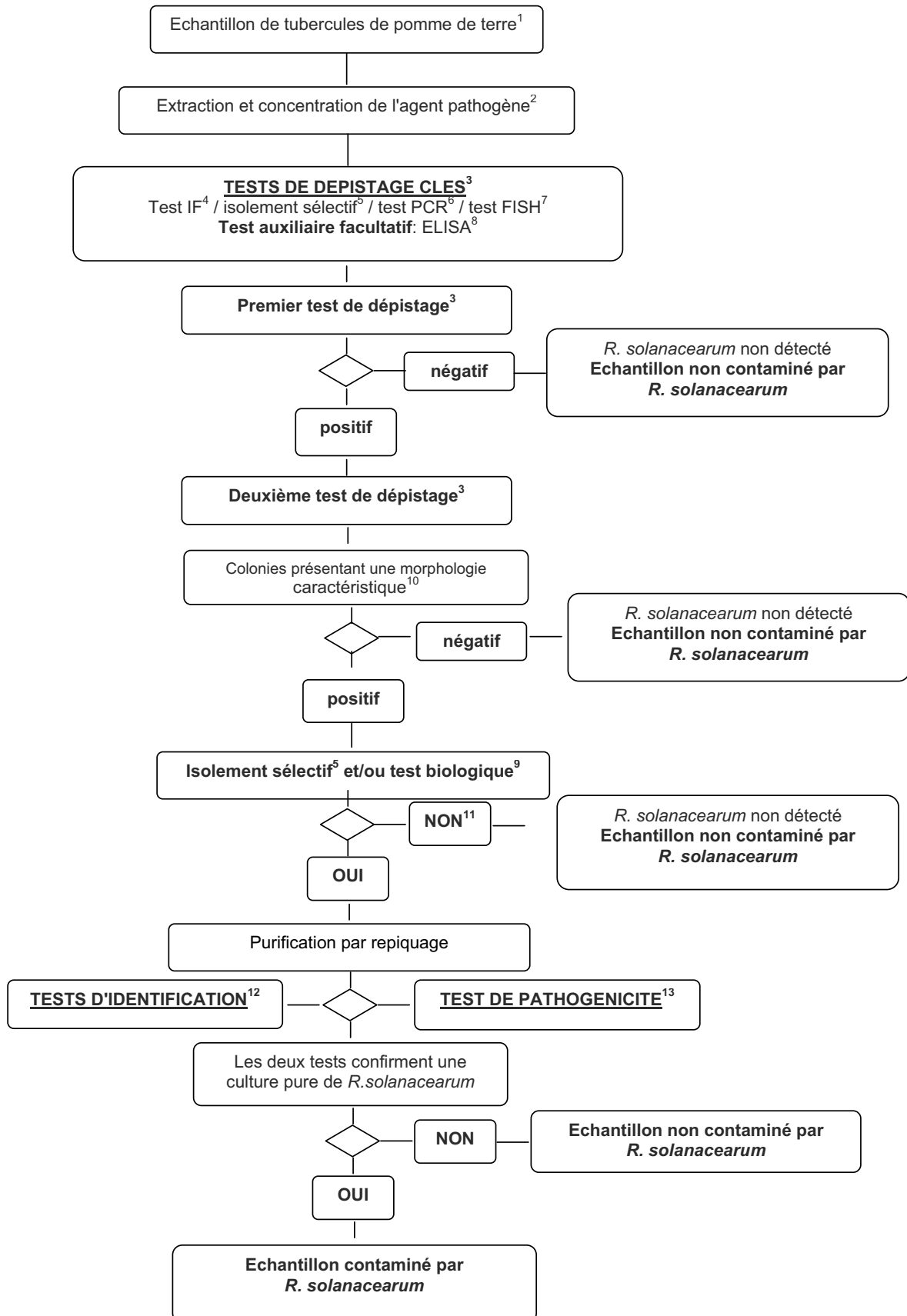
- (1) La description des symptômes figure à la section II.1.
- (2) Des tests rapides de dépistage facilitent le diagnostic supposé, mais ne sont pas essentiels. Un résultat négatif ne garantit pas toujours l'absence de l'agent pathogène.
- (3) Le test de purulence pour révéler l'exsudat bactérien des tissus vasculaires caulinaires est décrit dans la section VI.A.1.
- (4) Le test de mise en évidence des granules de poly-β-hydroxybutyrate dans les cellules bactériennes est décrit dans la section VI.A.2.
- (5) Les tests de séro-agglutination sur l'exsudat bactérien ou les extraits de tissus symptomatiques sont décrits dans la section VI.A.3.
- (6) Le test IF sur l'exsudat bactérien en suspension dans l'eau ou les extraits de tissus symptomatiques est décrit dans la section VI.A.5.
- (7) Le test FISH sur l'exsudat bactérien en suspension dans l'eau ou les extraits de tissus symptomatiques est décrit dans la section VI.A.7.
- (8) Le test ELISA sur l'exsudat bactérien en suspension dans l'eau ou les extraits de tissus symptomatiques est décrit dans la section VI.A.8.
- (9) Le test PCR sur l'exsudat bactérien en suspension dans l'eau ou les extraits de tissus symptomatiques est décrit dans la section VI.A.6.
- (10) En général, l'agent pathogène est isolé facilement du matériel végétal symptomatique par dilution et étalement sur milieu de culture (section II.3).
- (11) La morphologie de la colonie typique est décrite dans la section II.3.d.
- (12) La mise en culture risque d'échouer à partir des stades d'infection avancés en raison de la concurrence ou de la pullulation des bactéries saprophytes. Si les symptômes de la maladie sont caractéristiques mais que le test d'isolement est négatif, l'isolement doit être réitéré, de préférence par un test de dilution et étalement sur un milieu sélectif.
- (13) L'identification fiable des cultures pures d'isolats supposés de *R. solanacearum* nécessite les tests décrits dans la section VI.B. Une caractérisation sous spécifique est facultative, mais recommandée pour chaque nouveau cas.
- (14) Le test de pathogénicité est décrit dans la section VI.C.

2. Procédure pour détecter et identifier *Ralstonia solanacearum* sur des échantillons de tubercules de pomme de terre asymptomatiques

Principe:

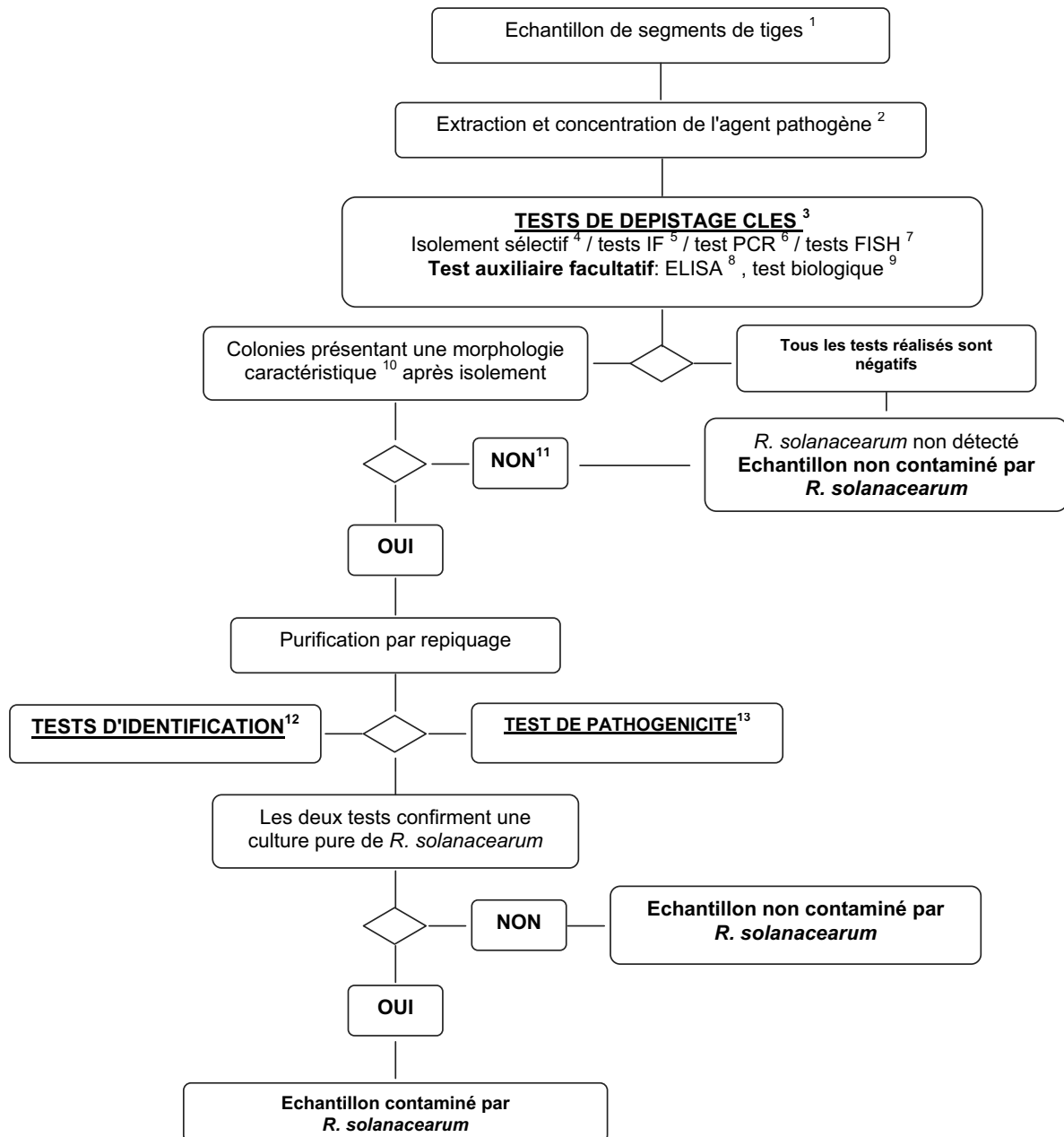
La procédure de test vise à détecter des infections latentes de tubercules de pomme de terre. Un résultat positif d'au moins deux tests de dépistage (voir ³.) basés sur des principes biologiques différents doit être complété par l'isolement de l'agent pathogène, suivi, en cas d'isolement de colonies caractéristiques, de la confirmation d'une culture pure comme étant *R. solanacearum*. Un résultat positif d'un seul test de dépistage n'est pas suffisant pour considérer l'échantillon comme suspect.

Les tests de dépistage et les tests d'isolement doivent permettre de détecter 10^3 à 10^4 cellules/ml d'extrait concentré remis en suspension, inclus comme témoins positifs dans chaque série de tests.



- (1) La taille de l'échantillon standard est de 200 tubercules. Cependant, la procédure peut être appliquée à des échantillons moins importants si 200 tubercules ne sont pas disponibles.
- (2) L'extraction de l'agent pathogène et les méthodes de concentration sont décrites dans la section III.1.1.
- (3) Si au moins deux tests basés sur des principes biologiques différents sont positifs, l'isolement et la confirmation doivent être effectués. Réaliser au moins un test de dépistage. Lorsque ce test est négatif, l'échantillon est considéré comme négatif. Si ce test est positif, un deuxième test de dépistage ou plusieurs tests de dépistage basés sur des principes biologiques différents sont requis pour vérifier le premier résultat positif. Si le deuxième test ou les autres tests sont négatifs, l'échantillon est considéré comme négatif. D'autres tests ne sont pas nécessaires.
- (4) Le test IF est décrit dans la section VI.A.5.
- (5) Le test d'isolement sélectif est décrit dans la section VI.A.4.
- (6) Les tests PCR sont décrits dans la section VI.A.6.
- (7) Le test FISH est décrit dans la section VI.A.7.
- (8) Les tests ELISA sont décrits dans la section VI.A.8.
- (9) Le test biologique est décrit dans la section VI.A.9.
- (10) La morphologie caractéristique de la colonie est décrite dans la section II.3.d.
- (11) La mise en culture ou les tests biologiques risquent d'échouer en raison de la concurrence ou de l'inhibition des bactéries saprophytes. Si l'on obtient des résultats positifs clairs par les tests de dépistage, mais des tests d'isolement qui sont négatifs, il convient de réitérer les tests d'isolement à partir du même extrait concentré ou en prélevant du tissu vasculaire supplémentaire près du talon de tubercules coupés du même échantillon et, au besoin, de tester des échantillons supplémentaires.
- (12) L'identification fiable de cultures pures d'isolats supposés de *R. solanacearum* nécessite les tests décrits dans la section VI.B.
- (13) Le test de pathogénicité est décrit dans la section VI.C.

3. Procédure pour détecter et identifier *Ralstonia solanacearum* dans des échantillons de plantes de pommes de terre et de tomates ou d'autres plantes hôtes asymptomatiques.



(¹) Voir section III.2.1. pour la taille recommandée des échantillons.

(²) L'extraction de l'agent pathogène et les méthodes de concentration sont décrites dans la section III.2.1.

(³) Si au moins deux tests basés sur des principes biologiques différents sont positifs, l'isolement et la confirmation doivent être effectués. Réaliser au moins un test de dépistage. Lorsque ce test est négatif, l'échantillon est considéré comme négatif. Si ce test est positif, un deuxième test de dépistage ou plusieurs tests de dépistage basés sur des principes biologiques différents sont requis pour vérifier le premier résultat positif. Si le deuxième test ou les autres tests sont négatifs, l'échantillon est considéré comme négatif. D'autres tests ne sont pas nécessaires.

(⁴) Le test d'isolement sélectif est décrit dans la section VI.A.4.

(⁵) Le test IF est décrit dans la section VI.A.5.

(⁶) Les tests PCR sont décrits dans la section VI.A.6.

(⁷) Le test FISH est décrit dans la section VI.A.7.

(⁸) Les tests ELISA sont décrits dans la section VI.A.8.

(⁹) Le test biologique est décrit dans la section VI.A.9.

(¹⁰) La morphologie caractéristique de la colonie est décrite dans la section II.3.d.

(¹¹) La mise en culture ou les tests biologiques risquent d'échouer en raison de la concurrence ou de l'inhibition des bactéries saprophytes. Lorsque des résultats positifs clairs sont obtenus par les tests de dépistage, mais que les tests d'isolement sont négatifs, il convient de réitérer les tests d'isolement.

(¹²) Une identification fiable de cultures pures d'isolats supposés de *R. solanacearum* est obtenue en utilisant les tests décrits dans la section VI.B.

(¹³) Le test de pathogénicité est décrit dans la section VI.C.

SECTION II

METHODES DETAILLEES POUR DETECTER *RALSTONIA SOLANACEARUM* SUR DES TUBERCULES DE POMME DE TERRE ET DES PLANTES DE POMME DE TERRE ET DE TOMATE OU D'AUTRES PLANTES HOTES PRESENTANT DES SYMPTOMES DE FLETRISSEMENT BACTERIEN.

1. SYMPTOMES (VOIR SITE WEB <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>)

1.1. Symptômes sur les pommes de terre

Plante de pomme de terre. Le premier stade de l'infection dans le champ se traduit par un flétrissement des feuilles du haut de la plante à température élevée pendant la journée et un retour à l'aspect normal pendant la nuit. Au cours des premiers stades du flétrissement, les feuilles restent vertes, mais plus tard un jaunissement et une nécrose brune se développent. L'épinastie apparaît également. Le flétrissement d'une pousse ou de plants entiers devient rapidement irréversible et se termine par l'effondrement et la mort de la plante. On peut observer un brunissement du tissu vasculaire des tiges de plantes flétries coupées transversalement, et un exsudat bactérien laiteux apparaît à la surface de la coupe ou peut en être extrait en pinçant la tige. Lorsqu'une tige coupée est placée dans l'eau verticalement, des filets de productions bactériennes s'écoulent des faisceaux vasculaires.

Tubercule de pomme de terre. Les tubercules de pomme de terre doivent être coupés transversalement, près du talon (stolon) ou longitudinalement jusqu'au stolon. Le premier stade de l'infection se traduit par une coloration jaune vitreuse à brun clair de l'anneau vasculaire, d'où émerge un suintement bactérien crémeux pâle spontanément après quelques minutes. Par la suite, la décoloration vasculaire devient plus nettement brune et la nécrose s'étend parfois au tissu parenchymateux. Aux stades avancés, l'infection se propage à partir du talon et des yeux et un liquide bactérien peut suinter, provoquant l'adhérence des particules de sol. L'épiderme des tubercules peut alors présenter des lésions brun rougeâtre légèrement concaves en raison de l'effondrement interne du tissu vasculaire. Le développement secondaire de pourritures fongiques et bactériennes est commun aux stades avancés de la maladie.

1.2. Symptômes sur les tomates

Plante de tomate. Le premier symptôme visible est la flaccidité des plus jeunes feuilles. Dans des conditions favorables à l'agent pathogène (température du sol d'environ 25 °C, humidité saturée), l'épinastie et le flétrissement d'un côté de la plante ou de l'ensemble de la plante surviennent en quelques jours et provoquent l'effondrement complet de la plante. Dans des conditions moins favorables (température du sol inférieure à 21 °C), le flétrissement est moindre, mais un grand nombre de racines adventices peuvent se développer sur la tige. On peut observer le long de la tige des stries imbibées d'eau partant de la base de la tige qui témoignent de la nécrose du système vasculaire. Lorsque la tige est coupée transversalement, un exsudat bactérien blanc ou jaunâtre s'écoule du tissu vasculaire brun décoloré de celle-ci.

1.3. Symptômes sur d'autres hôtes

Solanum dulcamara et *S. nigrum*. Dans des conditions naturelles, des symptômes de flétrissement sont rarement observés sur ces hôtes adventices, sauf si les températures du sol sont supérieures à 25 °C ou si les niveaux d'inoculum sont extrêmement élevés (p. ex.: pour *S. nigrum* se développant dans le voisinage de plantes de pomme de terre ou de tomate malades). Lorsque le flétrissement apparaît, les symptômes sont pareils à ceux décrits pour la tomate. Les plants de *S. dulcamara* qui ne se flétrissent pas et se développent avec des tiges et des racines dans l'eau peuvent révéler une légère décoloration brune du tissu vasculaire sur la partie transversale de la base de la tige ou les parties sous eau de la tige. Des bactéries peuvent suinter du tissu vasculaire coupé ou constituer des filets de productions bactériennes si la tige coupée est placée verticalement dans l'eau, même en l'absence de symptômes de flétrissement.

2. TESTS RAPIDES DE DEPISTAGE

Des tests rapides de dépistage peuvent faciliter le diagnostic supposé, mais ne sont pas essentiels. Utiliser un ou plusieurs des tests validés suivants:

2.1. Test d'exsudation des tiges

(voir section VI.A.1.)

2.2. Mise en évidence des granules de poly-β-hydroxybutyrate (PHB)

La coloration au bleu du Nil A ou au noir du Soudan B (voir section VI.A.2) de frottis fixés à la chaleur d'exsudat bactérien de tissu infecté sur une lame de microscope permet de visualiser les granules caractéristiques de PHB présents dans les cellules de *R. solanacearum*.

2.3. Tests de séro-agglutination

(voir section VI.A.3.)

2.4. Autres tests

Parmi les autres tests rapides de dépistage, on peut citer le test IF (voir section VI.A.5.), le test FISH (voir section VI.A.7.), les tests ELISA (voir section VI.A.8.) et les tests PCR (voir section VI.A.6.).

3. PROCEDURE D'ISOLEMENT

- a) Prélever de l'exsudat ou des morceaux de tissu décoloré, soit à partir de l'anneau vasculaire du tubercule de pomme de terre, soit à partir des vaisseaux de la tige de pomme de terre, de tomate ou d'autres plantes hôtes flétries. Mettre en suspension dans un petit volume d'eau distillée stérile ou dans un tampon au phosphate 50 mM (appendice 4). Laisser reposer 5 à 10 minutes.
- b) Préparer une série de dilutions au dixième de la suspension.
- c) Transférer 50-100 µl de la suspension et des dilutions sur un milieu de culture général (NA, YPGA ou SPA; voir appendice 2) et/ou sur le milieu tétrazolium de Kelman (appendice 2), et/ou sur un milieu sélectif validé (par ex.: SMSA; voir appendice 2). Etaler à l'aide d'une technique appropriée par dilution et étalement. Si cela est jugé utile, préparer des boîtes de Petri séparées avec une suspension de cellules diluées appartenant au biovar 2 de *R. solanacearum* comme témoin positif.
- d) Incuber les boîtes pendant 2 à 6 jours à 28 °C.
 - Sur le milieu nutritif général, les isolats virulents de *R. solanacearum* forment des colonies fluides, à bord irrégulier, plates, blanchâtres et présentant fréquemment des verticilles caractéristiques au centre. Les formes non virulentes de *R. solanacearum* forment de petites colonies arrondies non fluides, butyreuses de couleur uniforme blanchâtre.
 - Sur le milieu tétrazolium de Kelman et sur le milieu SMSA, les verticilles sont de couleur rouge sang. Les formes non virulentes de *R. solanacearum* forment de petites colonies arrondies non fluides, butyreuses de couleur uniforme rouge sombre.

4. TESTS D'IDENTIFICATION DE *R. SOLANACEARUM*

Les tests permettant de confirmer l'identification d'isolats supposés de *R. solanacearum* sont indiqués dans la section VI.B.

SECTION III

1. METHODES DETAILLEES POUR DETECTER ET IDENTIFIER *RALSTONIA SOLANACEARUM* SUR DES ECHANTILLONS DE TUBERCULES DE POMME DE TERRE ASYMPTOMATIQUES

1.1. Préparation de l'échantillon

Remarque:

- 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. Cependant, la procédure peut être appliquée facilement à des échantillons de moins de 200 tubercules lorsqu'un nombre moins élevé de tubercules est disponible.
- 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, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Prétraitement facultatif préalable à la préparation de l'échantillon:

- a) Incuber les échantillons à 25-30 °C pendant une période pouvant aller jusqu'à deux semaines avant de réaliser les tests afin d'encourager la multiplication de populations éventuelles de *R. solanacearum*.
 - b) Laver les tubercules en utilisant des désinfectants (composés chlorés lorsque le test PCR doit être utilisé pour éliminer l'ADN pathogène) et des détergents appropriés entre chaque échantillon. Sécher les tubercules à l'air. Cette procédure de lavage est particulièrement utile (mais pas obligatoire) pour les échantillons comportant des particules de sol en excédent et si un test PCR ou une procédure d'isolement direct doivent être mis en œuvre.
- 1.1.1. Enlever la peau de chaque tubercule au niveau du talon (stolon) au moyen d'un scalpel ou d'un couteau à légumes propre et désinfecté, de façon à faire apparaître le tissu vasculaire. Découper soigneusement un petit noyau de tissu vasculaire au niveau du talon et prélever aussi peu que possible de tissu non vasculaire. (voir site web <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>)
- N.B.: Mettre de côté les tubercules (en voie de pourrissement) présentant des symptômes de pourriture brune suspects et les tester séparément.

Si, au cours du prélèvement du noyau de talon, des symptômes suspects de flétrissement bactérien sont observés, il convient de procéder à une inspection visuelle de ce tubercule et de le couper à proximité du talon. Tout tubercule coupé présentant des symptômes suspects doit être conservé pendant au minimum deux jours à température ambiante afin de permettre une subérisation, et être entreposé réfrigéré (entre 4 et 10 °C) dans des conditions de quarantaine appropriées. Tous les tubercules, y compris ceux qui présentent des symptômes suspects, doivent être conservés conformément à l'annexe III.

- 1.1.2. Rassembler les noyaux de talons dans des récipients jetables inutilisés qui peuvent être fermés et/ou scellés (s'il s'agit de récipients réutilisés, ils doivent être nettoyés et désinfectés complètement à l'aide de composés chlorés). Il est préférable de traiter immédiatement les noyaux de talons. Sinon, il convient de les entreposer dans le récipient, sans addition de tampon, pour une période de moins de 72 heures réfrigérés ou de moins de 24 heures à température ambiante.

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

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

N.B.: Le risque de contaminations croisées d'échantillons est élevé lorsque les échantillons sont homogénéisés en utilisant un mixeur. Prendre des précautions pour éviter la production d'aérosol ou des débordements pendant le processus d'extraction. Veiller à utiliser des lames de mixeur et des récipients² fraîchement stérilisés pour chaque échantillon. En cas d'utilisation du test PCR, éviter le transfert d'ADN sur les récipients ou le dispositif de broyage. Le broyage dans des sacs jetables et l'utilisation de tubes jetables sont recommandés en cas de recours au test PCR.

- 1.1.3. Décanter le liquide surnageant. S'il est excessivement trouble, le clarifier par une centrifugation à basse vitesse (à 180 g au maximum pendant 10 minutes, à une température de 4 à 10 °C) ou par une filtration sous vide (40-100 µm), en lavant le filtre avec un tampon d'extraction supplémentaire (~10 ml).
- 1.1.4. Concentrer la fraction bactérienne par centrifugation à 7 000 g pendant 15 minutes (ou à 10 000 g pendant 10 minutes) à une température de 4 à 10 °C et jeter le surnageant sans déranger l'extrait concentré.
- 1.1.5. Remettre en suspension l'extrait concentré dans un tampon concentré de 1,5 ml (appendice 4). Utiliser 500 µl pour tester *R. solanacearum*, 500 µl pour *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* 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 restant, homogénéiser 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.

Une congélation et un dégel répétés ne sont pas recommandés.

Si le transport de l'extrait est requis, veiller à effectuer la livraison dans une glacière dans un délai de 24 heures.

- 1.1.6. Il est impératif que tous les témoins positifs et les échantillons de *R. solanacearum* soient traités séparément afin d'éviter toute contamination, aussi bien pour les lames d'immunofluorescence que pour tous les tests.

1.2. Tests

Voir le diagramme et la description des tests et des protocoles optimisés dans les appendices concernés:

Isolement sélectif (voir section VI.A.4.)

Test IF (voir section VI.A.5.)

Tests PCR (voir section VI.A.6.)

Test FISH (voir section VI.A.7.)

Tests ELISA (voir section VI.A.8.)

Test biologique (voir section VI.A.9.)

2. METHODES DETAILLEES POUR DETECTER ET IDENTIFIER *R. SOLANACEARUM* DANS DES ECHANTILLONS DE PLANTES DE POMME DE TERRE ET DE TOMATE OU D'AUTRES PLANTES HOTES ASYMPTOMATIQUES

2.1. Préparation de l'échantillon

*N.B.: Pour détecter des populations latentes de *R. solanacearum*, il est conseillé de tester des échantillons composites. La procédure peut facilement être appliquée à des échantillons composites comportant jusqu'à 200 morceaux de tiges. Lorsque des recherches sont réalisées, elles doivent être basées sur un échantillon statistiquement représentatif de la population végétale considérée.*

- 2.1.1. Collecter des segments de tiges de 1 à 2 cm dans un récipient stérile fermé suivant les procédures de prélèvement suivantes:

Plantules de tomate de pépinière: Enlever au moyen d'un couteau propre et désinfecté un segment de 1 cm à la base de chaque tige, juste au-dessus du niveau du sol.

Plantes de tomate cultivées en serre ou en plein champ: Enlever au moyen d'un couteau propre et désinfecté la pousse latérale la plus basse de chaque plante en coupant juste au-dessus de la jonction avec la tige principale. Enlever le segment de 1 cm le plus bas de chaque pousse latérale.

Autres hôtes: Enlever au moyen d'un couteau ou d'un sécateur propre et désinfecté un segment de 1 cm à la base de chaque tige, juste au-dessus du niveau du sol. Dans le cas de *S. dulcamara* ou d'autres plantes hôtes poussant dans l'eau, enlever des morceaux de 1 à 2 cm des tiges se trouvant sous l'eau ou des stolons ayant des racines aquatiques.

En cas de prélèvement dans un lieu particulier, il est recommandé de tester un échantillon statistiquement représentatif d'au moins 10 plants par point de prélèvement de chaque adventice hôte potentiel. La détection de l'agent pathogène sera le plus fiable à la fin du printemps, en été et en automne, bien que des infections naturelles puissent être détectées tout au long de l'année dans les *Solanum dulcamara* pérennantes poussant dans les cours d'eau. Parmi les hôtes connus figurent les plants de pommes de terre spontanés (repousses), *Solanum dulcamara*, *S. nigrum*, *Datura stramonium* et d'autres membres de la famille des solanacées. *Pelargonium* spp. et *Portulaca oleracea* sont également des hôtes. Parmi certaines adventices spp. européennes qui peuvent abriter des populations du biovar 2, race 3 de *R. solanacearum* dans les racines et/ou les rhizosphères dans des conditions environnementales spécifiques, on peut citer *Atriplex hastata*, *Bidens pilosa*, *Cerastium glomeratum*, *Chenopodium album*, *Eupatorium cannabinum*, *Galinsoga parviflora*, *Ranunculus scleratus*, *Rorippa* spp., *Rumex* spp., *Silene alba*, *S. nutans*, *Tussilago farfara* et *Urtica dioica*.

N.B.: Un examen visuel des symptômes internes (coloration vasculaire ou exsudat bactérien) peut être effectué à ce stade. Mettre de côté tout segment de tige présentant des symptômes et le tester séparément (voir section II).

- 2.1.2. Désinfecter brièvement les segments avec de l'éthanol à 70 % et les sécher immédiatement avec du papier absorbant. Ensuite, traiter les segments de tiges en suivant l'une des procédures ci-dessous:
- a) soit recouvrir les segments avec un volume suffisant (environ 40 ml) de tampon d'extraction (appendice 4) et les placer sur un agitateur rotatif (50-100 tours/minute) pendant 4 heures à une température inférieure à 24 °C ou pendant 16 à 24 heures réfrigérés, ou
 - b) traiter immédiatement les segments en les broyant dans un sac de macération résistant (p. ex.: Stomacher ou Bioreba) avec un volume approprié de tampon d'extraction (appendice 4) en utilisant un maillet en caoutchouc ou un dispositif de broyage approprié (par ex.: Homex). Si ce n'est pas possible, stocker les segments pas plus de 72 heures réfrigérés ou de 24 heures à température ambiante.
- 2.1.3. Décanter le surnageant après sédimentation pendant 15 minutes.
- 2.1.4. Une nouvelle clarification de l'extrait ou du concentré de la fraction bactérienne n'est habituellement pas requise, mais peut être réalisée par filtration et/ou centrifugation selon la méthode décrite dans la section III. 1.1.3 – 1.1.5.
- 2.1.5. Diviser l'extrait d'échantillon initial ou concentré en deux parties égales. Maintenir une moitié à une température de 4 à 10 °C au cours du test et entreposer l'autre moitié avec 10 à 25 % (en volume) de glycérol stérile à une température de -16 à -24 °C (semaines) ou de -68 à -86 °C (mois) si un test supplémentaire est requis.

2.2. Tests

Voir le diagramme et la description des tests et les protocoles optimisés dans les appendices concernés:

Isolement sélectif (voir section VI.A.4.)

Test IF (voir section VI.A.5.)

Tests PCR (voir section VI.A.6.)

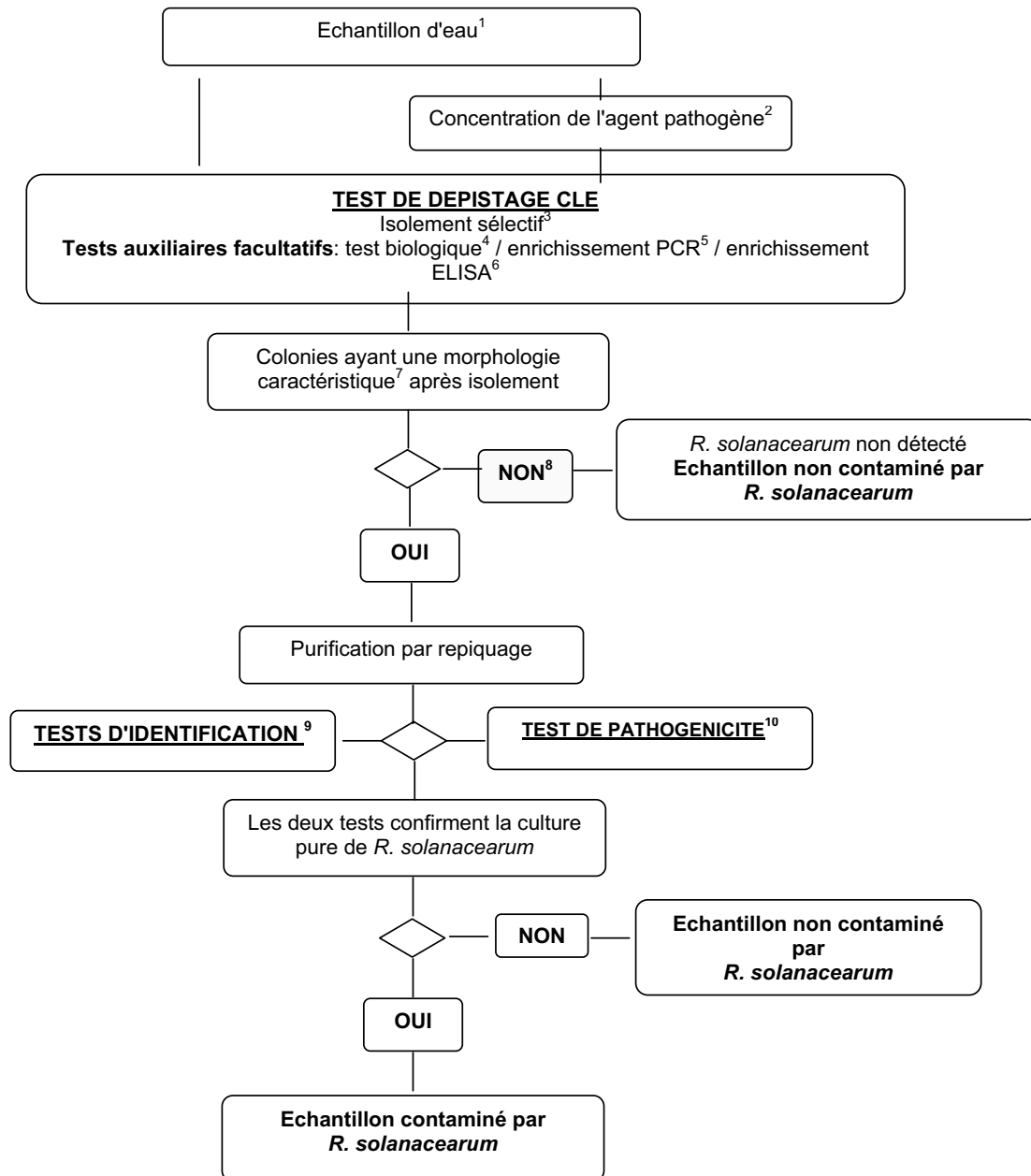
Test FISH (voir section VI.A.7.)

Tests ELISA (voir section VI.A.8.)

Test biologique (voir section VI.A.9.)

SECTION IV

1. PROCEDURE POUR DETECTER ET IDENTIFIER *R. SOLANACEARUM* DANS L'EAU



(1) Voir section IV.2.1. pour les procédures de prélèvement recommandées.

(2) Les méthodes de concentration de l'agent pathogène sont décrites dans la section IV.2.1. La concentration augmente les populations de l'agent pathogène et des bactéries saprophytes concurrentes et n'est recommandée que si elle n'entraîne pas l'inhibition du test d'isolement.

(3) Le test d'isolement sélectif est décrit dans la section VI.A.4.

(4) Le test biologique est décrit dans la section VI.A.9.

(5) Les méthodes d'enrichissement PCR sont décrites dans les sections VI.A.4.2 et VI.A.6.

(6) Les méthodes d'enrichissement ELISA sont décrites dans les sections VI.A.4.2 et VI.A.8.

(7) La morphologie caractéristique de la colonie est décrite dans la section II.3.d.

(8) La mise en culture peut échouer en raison de la concurrence ou de l'effet inhibiteur de bactéries saprophytes. Si des populations importantes de saprophytes sont soupçonnées de mettre en cause la fiabilité de l'isolement, recommencer les tests d'isolement après dilution de l'échantillon dans de l'eau stérile.

(9) L'identification fiable de cultures pures d'isolats supposés de *R. solanacearum* nécessite les tests décrits dans la section VI.B.

(10) Le test de pathogénicité est décrit dans la section VI.C.

2. METHODES POUR DETECTER ET IDENTIFIER *R. SOLANACEARUM* DANS L'EAU

Principe

La procédure de détection validée décrite dans la présente section est applicable pour la détection de l'agent pathogène dans les échantillons d'eaux de surface et peut également être utilisée pour tester les échantillons d'effluents issus de la transformation de pommes de terre ou d'effluents d'eaux usées. Cependant, il importe de noter que la sensibilité prévue de la détection variera avec le substrat. La sensibilité du test d'isolement est perturbée par des populations de bactéries saprophytes concurrentes qui sont généralement beaucoup plus importantes dans les effluents issus de la transformation de pommes de terre et les effluents d'eaux usées que dans les eaux de surface. Alors que la procédure ci-après ne doit détecter que 103 cellules/l dans les eaux de surface, la sensibilité de la détection dans les effluents issus de la transformation de pommes de terre ou les effluents d'eaux usées est susceptible d'être considérablement plus faible. Pour cette raison, il est recommandé de tester les effluents après les traitements de purification éventuels (p. ex.: sédimentation ou filtration) au cours desquels les populations de bactéries saprophytes sont réduites. Les limitations de la sensibilité de la procédure de test doivent être envisagées lors de l'évaluation de la fiabilité des résultats négatifs obtenus, le cas échéant. Tandis que cette procédure a été couronnée de succès lors de son utilisation dans des études visant à déterminer la présence ou l'absence de l'agent pathogène dans les eaux de surface, ses limitations doivent être prises en considération lorsqu'elle est utilisée dans des travaux semblables concernant les effluents issus de la transformation de pommes de terre ou les effluents d'eaux usées.

2.1. Préparation de l'échantillon

Remarque:

- *La détection de *R. solanacearum* dans les eaux de surface est le plus fiable à la fin du printemps, en été et en automne, lorsque les températures de l'eau sont supérieures à 15 °C.*
- *Le fait de recommencer le prélèvement à des moments différents au cours de la période susmentionnée dans des points de prélèvement désignés augmentera la fiabilité de la détection en réduisant les conséquences des variations climatiques.*
- *Tenir compte des conséquences de pluies abondantes et de la géographie du cours d'eau afin d'éviter des effets de dilution importants qui peuvent occulter la présence de l'agent pathogène.*
- *Prélever des échantillons d'eaux de surface à proximité de plantes hôtes si ces plantes hôtes sont présentes.*

2.1.1. Dans des points de prélèvement sélectionnés, collecter des échantillons d'eau en remplissant des tubes ou des bouteilles stériles jetables à une profondeur si possible supérieure à 30 cm et à une distance maximale de 2 m de la berge. Pour les effluents issus de la transformation de pommes de terre ou les effluents d'eaux usées, collecter des échantillons au point de rejet des effluents. La taille des échantillons recommandée va jusqu'à 500 ml par point de prélèvement. Si la préférence est donnée à des échantillons plus modestes, il est conseillé de prélever des échantillons au moins à trois reprises par point de prélèvement, chaque échantillon consistant en deux sous-échantillons répliqués d'au moins 30 ml. Pour une étude intensive, sélectionner au minimum trois points de prélèvement pour 3 km de cours d'eau et veiller à ce que les affluents du cours d'eau fassent également l'objet d'un prélèvement.

2.1.2. Transporter les échantillons dans des conditions d'obscurité et à basse température (4-10 °C) et tester dans un délai de 24 heures.

2.1.3. Au besoin, la fraction bactérienne peut être concentrée par l'une des méthodes suivantes:

- a) Centrifuger 30-50 ml de sous-échantillons à 10 000 g pendant 10 minutes (ou à 7 000 g pendant 15 minutes), de préférence à une température de 4 à 10 °C, éliminer le surnageant et remettre en suspension l'extrait concentré dans un tampon concentré de 1 ml (appendice 4).
- b) Filtration sur membrane (dimension minimale des pores de 0,45 µm) suivie du lavage du filtre dans 5-10 ml de tampon concentré et rétention des solutions de lavage. Cette méthode convient à de grands volumes d'eau contenant un petit nombre de saprophytes.

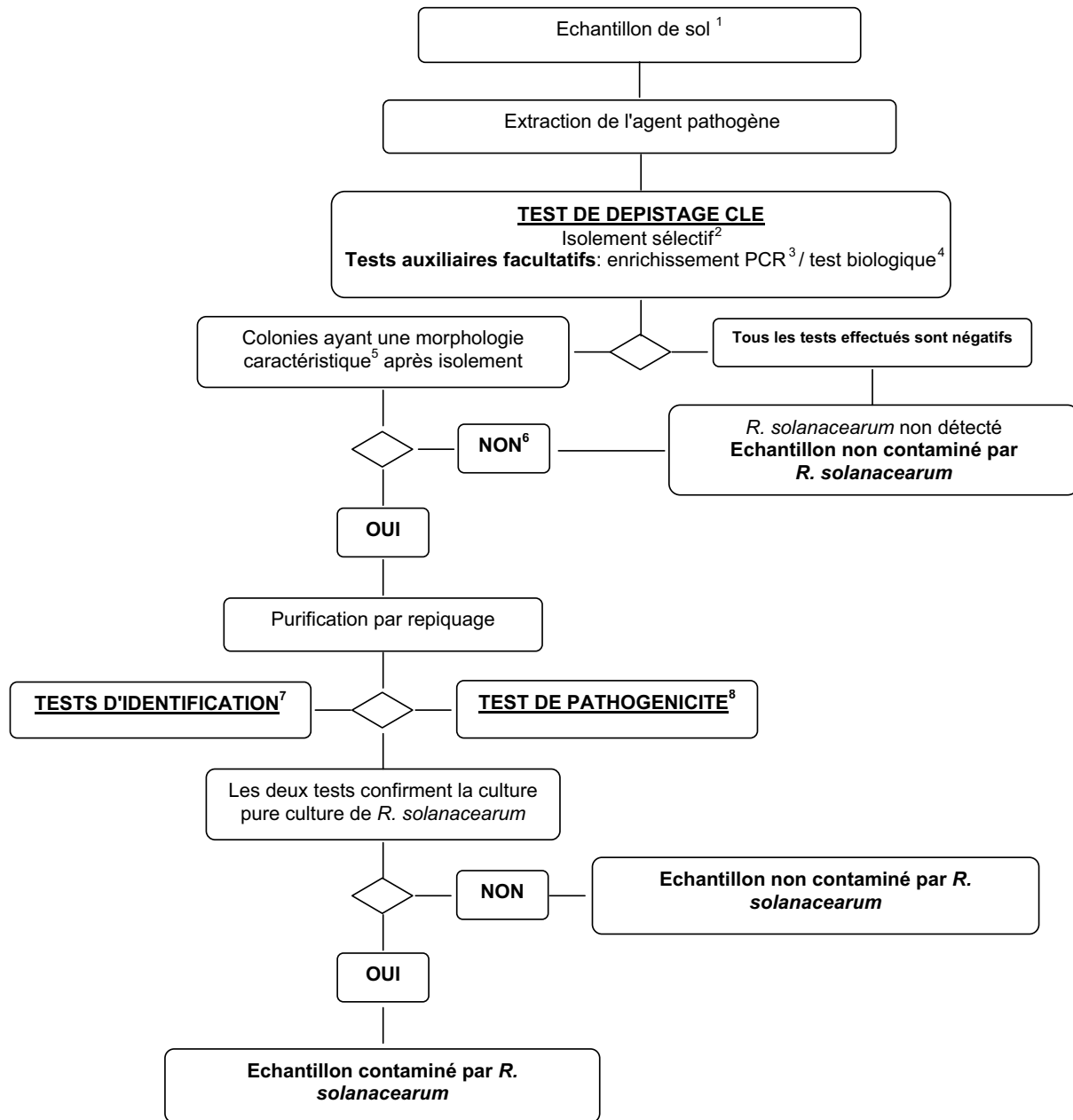
La concentration n'est généralement pas recommandée pour les échantillons d'effluents issus de la transformation de pommes de terre ou d'effluents d'eaux usées, étant donné que des populations plus importantes de bactéries saprophytes concurrentes auront un effet inhibiteur sur la détection de *R. solanacearum*.

2.2. Tests

Voir le diagramme et la description des tests dans les appendices concernés.

SECTION V

1. PROCEDURE POUR DETECTER ET IDENTIFIER *R. SOLANACEARUM* DANS LE SOL



(1) Voir section V.2.1. pour les procédures de prélèvement recommandées.

(2) Le test d'isolement sélectif est décrit dans la section VI.A.4.

(3) Les méthodes d'enrichissement PCR sont décrites dans les sections VI.A.4.2 et VI.A.6.

(4) Le test biologique est décrit dans la section VI.A.9.

(5) La morphologie caractéristique de la colonie est décrite dans la section II.3.d.

(6) La mise en culture peut échouer en raison de la concurrence ou de l'effet inhibiteur de bactéries saprophytes. Si des populations importantes de saprophytes sont soupçonnées de mettre en cause la fiabilité de l'isolement, recommencer les tests d'isolement après une nouvelle dilution de l'échantillon.

(7) L'identification fiable des cultures pures supposées de *R. solanacearum* nécessite les tests décrits dans la section VI.B.

(8) Le test de pathogénicité est décrit dans la section VI.C.

2. METHODES POUR DETECTER ET IDENTIFIER *R. SOLANACEARUM* DANS LE SOL

Principes

La procédure de détection validée décrite dans la présente section est applicable pour la détection de l'agent pathogène dans des échantillons de sol mais peut également être utilisée pour tester les échantillons de déchets solides issus de la transformation de pommes de terre ou de boues d'épuration. Cependant, il convient de noter que ces méthodes ne sont pas assez sensibles pour garantir la détection de populations faibles et/ou inégalement dispersées de *R. solanacearum* pouvant apparaître dans des échantillons naturellement contaminés de ces substrats.

Les limitations de la sensibilité de cette procédure de test doivent être envisagées lors de l'évaluation de la fiabilité de résultats négatifs obtenus et également lors de son utilisation dans des études visant à déterminer la présence ou l'absence de l'agent pathogène dans les sols ou les boues. Le test le plus fiable de détection de la présence de l'agent pathogène dans le sol d'un champ est de planter un hôte sensible et de surveiller son infection éventuelle, mais même avec cette méthode, de faibles degrés de contamination échapperont à la détection.

2.1. Préparation de l'échantillon

- 2.1.1. Le prélèvement de sol du champ doit suivre les normes fondamentales utilisées pour le prélèvement de nématodes. Collecter de 0,5 à 1 kg de sol par échantillon dans 60 sites pour 0,3 ha à une profondeur de 10 à 20 cm (ou dans un tamis de 7x7 mètres). Si l'on soupçonne la présence de l'agent pathogène, accroître le nombre de points de collecte à 120 pour 0,3 ha. Maintenir les échantillons à une température de 12 à 15 °C avant le test. Prélever les boues issues de la transformation de pommes de terre et les boues d'épuration en collectant au total 1 kg dans des sites représentant le volume total de boues à tester. Bien mélanger chaque échantillon avant le test.
- 2.1.2. Disperser les sous échantillons de 10 à 25 g de sol ou de boue avec un agitateur rotatif (250 tours/minute) dans un tampon d'extraction de 60 à 150 ml (appendice 4) pendant 2 heures au maximum. Au besoin, l'ajout de 0,02 % de Tween-20 stérile et de 10 à 20 g de gravier stérile peut favoriser la dispersion.
- 2.1.3. Maintenir la suspension à 4 °C pendant le test.

2.2. Tests

Voir le diagramme et la description des tests dans les appendices concernés.

SECTION VI

PROTOCOLES OPTIMISES POUR DETECTER ET IDENTIFIER *R. SOLANACEARUM*

A. DIAGNOSTIC ET TESTS DE DETECTION

1. TEST D'EXSUDATION DES TIGES

La présence de *R. solanacearum* dans des tiges de pommes de terre, de tomates ou d'autres plantes hôtes flétries peut être mise en évidence en procédant au simple test de présomption suivant: sectionner la tige juste au-dessus du sol. Suspendre l'extrémité sectionnée dans un tube d'eau propre. Observer l'écoulement spontané et caractéristique de filets de productions bactériennes des faisceaux vasculaires coupés après quelques minutes.

2. MISE EN EVIDENCE DES GRANULES DE POLY-B-HYDROXYBUTYRATE

1. Préparer sur une lame de microscope un frottis à partir de l'exsudat bactérien du tissu infecté ou préparer un frottis à partir d'une culture de 48 heures sur gélose au levure peptone glucose (YPGA) ou à la peptone (SPA) (appendice 2).
2. Préparer des frottis témoins positifs obtenus avec une souche du biovar 2 de *R. solanacearum* et, si cela est jugé utile, un frottis témoin négatif d'un PHB négatif connu.
3. Laisser sécher et passer rapidement le côté inférieur de chaque lame dans une flamme jusqu'à ce que le frottis soit fixé.
4. Colorer la préparation au bleu du Nil ou au noir du Soudan et observer au microscope de la manière décrite ci après:

Test au bleu du Nil:

- a) Recouvrir chaque lame d'une solution aqueuse à 1 % de bleu du Nil A. Incuber 10 minutes à 55 °C.
- b) Egoutter la solution colorante. Laver rapidement sous un filet d'eau courante. Enlever l'eau excédentaire avec du papier absorbant.
- c) Recouvrir le frottis dans une solution aqueuse d'acide acétique à 8 % et incuber 1 minute à température ambiante.
- d) Laver rapidement sous un filet d'eau courante. Enlever l'eau excédentaire avec du papier absorbant.
- e) Réhumecter en déposant une goutte d'eau et recouvrir d'une lamelle.
- f) Examiner le frottis coloré au microscope à épifluorescence sous un film d'huile de 450 nm, à un grossissement de 600 à 1 000, en utilisant un objectif à immersion dans l'huile ou dans l'eau.
- g) Observer la fluorescence orange vif des granules de PHB. Faire également des observations en lumière normale afin de vérifier le caractère intracellulaire des granules; vérifier que la morphologie des cellules est caractéristique de *R. solanacearum*.

Test au noir du Soudan:

- a) Recouvrir chaque lame avec une solution de noir du Soudan B à 0,3 % dans de l'éthanol à 70 % et incubé 10 minutes à température ambiante.
- b) Egoutter la solution colorante et laver rapidement à l'eau courante, enlever l'eau excédentaire avec du papier absorbant.
- c) Plonger rapidement les lames dans du xylol et sécher avec du papier absorbant. *Attention, le xylol est un produit dangereux; prendre les précautions nécessaires et travailler sous une hotte de chimiste.*
- d) Recouvrir les lames dans une solution aqueuse de safranine à 0,5 % et laisser 10 secondes à température ambiante. *Attention, la safranine est un produit dangereux; prendre les précautions nécessaires et travailler sous une hotte de chimiste.*
- e) Laver sous un filet d'eau courante, sécher avec du papier absorbant et recouvrir d'une lamelle.
- f) Examiner le frottis coloré au microscope à immersion sous un film d'huile, à un grossissement de 1 000, sous lumière transmise normale en utilisant un objectif à immersion dans l'huile.
- g) Observer la coloration bleu noir des granules de PHB dans les cellules de *R. solanacearum*; les parois des cellules sont colorées en rose.

3. TESTS DE SERO-AGGLUTINATION

L'agglutination des cellules de *R. solanacearum* sur l'exsudat bactérien ou les extraits de tissus symptomatiques s'observe le mieux en utilisant des anticorps validés (voir appendice 3) étiquetés par des marqueurs colorés appropriés tels que les cellules de *Staphylococcus aureus* rouge ou des particules de latex colorées. En cas d'utilisation d'un matériel disponible dans le commerce (voir appendice 3), suivre les instructions des producteurs. Sinon, suivre la procédure suivante:

- a) Mélanger les gouttes d'une suspension d'anticorps et d'exsudat bactérien marqués (environ 5 µl dans chaque cas) sur les fenêtres de lames de test multipuits.
- b) Préparer des témoins positifs et négatifs en utilisant des suspensions de biovar 2 de *R. solanacearum* et une souche hétérologue.
- c) Observer l'agglutination dans les échantillons positifs après avoir mélangé doucement pendant 15 secondes.

4. ISOLEMENT SELECTIF

4.1. Etalement sur milieu sélectif

*N.B.: Avant d'utiliser cette méthode pour la première fois, réaliser des tests préliminaires pour garantir une détection reproductible des 10^3 à 10^4 unités formant des colonies de *R. solanacearum* par ml ajouté aux extraits des échantillons dont les tests antérieurs étaient négatifs.*

Utiliser un milieu sélectif validé approprié, p. ex.: SMSA (modifié par Elphinstone et al., 1996; voir appendice 2).

*Il faut veiller également à différencier *R. solanacearum* des autres bactéries susceptibles de développer des colonies sur le milieu. En outre, les colonies de *R. solanacearum* peuvent présenter une morphologie atypique si les boîtes sont surpeuplées ou si des bactéries antagonistes sont également présentes. Lorsque l'on suspecte des effets de concurrence ou d'antagonisme, l'échantillon doit faire l'objet d'un nouveau test en utilisant un test différent.*

La plus grande sensibilité de détection par cette méthode peut être attendue lorsque l'on utilise des extraits d'échantillons fraîchement préparés. Cependant, la méthode est également applicable pour une utilisation avec des extraits qui ont été stockés sous du glycérol entre - 68 et - 86 °C.

Comme témoins positifs, préparer des dilutions au dixième d'une suspension de 10^6 ufc/ml d'une souche virulente de biovar 2 de *R. solanacearum* (p. ex.: NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857). Pour éviter toute possibilité de contamination, préparer des témoins positifs de manière totalement séparée des échantillons à tester.

Pour chaque lot nouvellement préparé de milieu sélectif, il y a lieu de tester s'il convient pour la croissance 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.

4.1.1. Effectuer le test avec une technique appropriée par dilution et étalement visant à garantir la dilution de toute population formant des colonies de saprophytes. Etaler 50 – 100 µl par boîte d'extrait d'échantillon et chaque dilution.

4.1.2. Incuber les boîtes à 28 °C. Relever les observations après 48 heures et ensuite quotidiennement pendant une durée allant jusqu'à six jours. Les colonies caractéristiques de *R. solanacearum* sur le milieu nutritif SMSA sont de couleur blanc laiteux, plates, irrégulières et fluides, et après trois jours d'incubation prennent une coloration rose à rouge sang au centre, présentant des stries internes ou des verticilles (voir site web <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

N.B.: Des colonies atypiques de R. solanacearum se constituent parfois sur ce milieu. Elles peuvent être petites, entièrement rouges et non fluides ou seulement fluides partiellement et donc difficiles à distinguer des bactéries saprophytes formant des colonies.

- 4.1.3. Purifier les colonies supposées de *R. solanacearum* après étalement ou dilution et étalement sur un milieu nutritif général pour obtenir des colonies isolées (voir appendice 2).
- 4.1.4. Les cultures peuvent être stockées à court terme dans de l'eau stérile (pH 6-8, sans chlore) à température ambiante et dans l'obscurité ou à long terme dans un milieu cryoprotecteur approprié entre - 68 et - 86 °C ou lyophilisées.
- 4.1.5. Identifier les cultures supposées (voir section VI.B.) et réaliser un test de pathogénicité (voir section VI.C).

Interprétation des résultats du test de dilution-étalement

Le test de dilution étalement est négatif si aucune colonie bactérienne n'est apparue au bout de six jours ou si aucune colonie caractéristique de *R. solanacearum* n'est isolée, sous réserve qu'aucune inhibition ne soit soupçonnée en raison de la concurrence ou de l'antagonisme d'autres bactéries et que des colonies caractéristiques de *R. solanacearum* soient isolées à partir des témoins positifs.

Le test de dilution étalement est positif si l'on peut isoler des colonies supposées de *R. solanacearum*.

4.2. Procédure d'enrichissement

Utiliser un milieu d'enrichissement validé tel que le bouillon nutritif modifié de Wilbrink (voir appendice 2).

Cette procédure peut être utilisée pour accroître sélectivement les populations de R. solanacearum dans des extraits d'échantillons et améliorer la sensibilité de détection. La procédure permet également la dilution des inhibiteurs de la réaction PCR (1:100). Il convient cependant de noter que l'enrichissement de R. solanacearum peut échouer en raison de la concurrence ou de l'antagonisme d'organismes saprophytes qui sont souvent enrichis simultanément. Par conséquent, l'isolement de R. solanacearum dans des bouillons de culture enrichis peut se révéler difficile. En outre, comme les populations de saprophytes sérologiquement proches peuvent être augmentées, l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques en lieu et place d'anticorps polyclonaux est recommandée en cas d'utilisation du test ELISA.

- 4.2.1. Pour l'enrichissement PCR, verser 100 µl d'extrait d'échantillon dans 10 ml de milieu nutritif liquide d'enrichissement (appendice 2) précédemment aliquoté dans des tubes ou des flacons exempts d'ADN. Pour l'enrichissement ELISA, des proportions plus importantes de milieu nutritif liquide peuvent être utilisées (p. ex: 100 µl dans 1,0 ml de milieu nutritif liquide d'enrichissement).
- 4.2.2. Incuber pendant 72 heures entre 27 et 30 °C dans une culture agitée ou statique sans refermer hermétiquement les bouchons pour permettre l'aération.
- 4.2.3. Bien mélanger avant d'utiliser pour des tests ELISA ou PCR.
- 4.2.4. Traiter le milieu nutritif liquide d'enrichissement de la même manière que les échantillons dans les tests ci-dessus.

N.B.: Si une inhibition ou un enrichissement de R. solanacearum est prévu en raison de populations importantes de certaines bactéries saprophytes concurrentes, l'enrichissement d'extraits d'échantillons avant toute centrifugation ou autres actions de concentration peut donner de meilleurs résultats.

5. 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 d'isolement, un test PCR ou un test 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.

N.B.: Utiliser une source validée d'anticorps de R. solanacearum (voir site <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). 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/ml d'une souche homologue de R. solanacearum en utilisant un conjugué approprié d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), conformément aux recommandations du fabricant. Les antisérums polyclonaux validés ont tous un titre d'immunofluorescence d'au moins 1:2 000. Lors du test, les dilutions de travail des anticorps doivent être approximativement égales ou égales à celles du titre.

Le test doit être effectué sur des extraits d'échantillon fraîchement préparés. Le cas échéant, il peut être valablement pratiqué 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 de 1 ml de tampon concentré (voir appendice 4), recentrifugation pendant 15 minutes à 7 000 g et remise en suspension dans le même volume de tampon concentré. Cela est rarement nécessaire, particulièrement si les échantillons sont fixés aux lames par flambage.

Préparer des lames témoins positives distinctes d'une souche homologue ou de toute autre souche de référence de *R. solanacearum*, en suspension dans l'extrait de pomme de terre, comme indiqué à l'appendice 3B et, à titre facultatif, dans le tampon.

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

Comme témoins négatifs, des aliquotes d'extraits d'échantillons qui ont donné précédemment des résultats négatifs aux tests de détection de *R. solanacearum* peuvent être utilisés.

Les matériels de contrôle normalisés positifs et négatifs disponibles pour une utilisation avec ce test sont énumérés à l'appendice 3.

Utiliser des lames pour microscope multipuits comportant de préférence dix fenêtres d'au moins 6 mm de diamètre.

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

5.1. Préparer les lames de test en utilisant l'une des méthodes suivantes:

- i) Extraits concentrés contenant relativement peu d'amidon:
Déposer à la pipette un volume standard (15 µl est une quantité suffisante pour un diamètre de fenêtre de 6 mm - choisir une quantité plus importante pour les fenêtres de plus grand diamètre) d'une dilution au 1/100^e d'extrait concentré de pomme de terre remis en suspension sur la première fenêtre. Ensuite, déposer à la pipette un volume similaire d'extrait concentré non dilué (1/1) sur les fenêtres restantes de la rangée. La deuxième rangée peut servir de double ou pour un deuxième échantillon, comme indiqué à la figure 1.
- ii) Dans le cas des autres extraits concentrés:
Préparer des dilutions décimales (1/10, 1/100) de l'extrait concentré remis en suspension dans le tampon concentré. Déposer à la pipette sur une rangée de fenêtres un volume standard (15 µl est une quantité suffisante pour un diamètre de fenêtre de 6 mm - choisir une quantité plus importante pour les fenêtres de plus grand diamètre) de l'extrait concentré remis en suspension et de chaque dilution. La deuxième rangée peut servir de double ou pour un deuxième échantillon, comme indiqué à la figure 2.

5.2. Laisser sécher les gouttelettes à température ambiante ou en chauffant à une température de 40 à 45 °C. Fixer les cellules bactériennes sur la lame en chauffant (15 minutes à 60 °C), en passant à la flamme, avec de l'éthanol à 95 % ou suivant les instructions spécifiques des fournisseurs des anticorps.

Au besoin, les lames fixées peuvent alors être réfrigérées et stockées dans une boîte à dessiccation pendant le temps nécessaire (au maximum 3 mois) avant un nouveau test.

5.3. Procédure du test d'immunofluorescence

- i) Conformément à la méthode de préparation des lames de test indiquée au point 5.1.i):
Préparer une série de dilutions au demi. Le premier puits devrait avoir 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 5.1. ii):
Préparer la dilution de travail de l'anticorps dans un tampon pour immunofluorescence. La dilution de travail a un effet sur la spécificité.

Figure 1. Préparation de la lame de test conformément aux points 5.1 i) et 5.3 i)

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

Figure 2. Préparation de la lame de test conformément aux points 5.1 ii) et 5.3 ii)

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

- 5.3.1. Disposer les lames sur du papier absorbant humide. Couvrir complètement chaque fenêtre de test avec une ou des dilutions d'anticorps. La quantité d'anticorps appliquée sur chaque fenêtre doit être au moins équivalente à la quantité d'extrait appliquée.
La procédure suivante devrait être mise en œuvre en l'absence d'instructions spécifiques des fournisseurs des anticorps:
- 5.3.2. Incuber les lames sur du papier humide sous un couvercle pendant 30 minutes à la température ambiante (18-25 °C).
- 5.3.3. Eliminer les gouttelettes de chaque lame et rincer soigneusement dans un tampon pour immunofluorescence. Laver pendant 5 minutes dans un tampon IF-Tween (appendice 4) et ensuite dans un tampon pour IF. Éviter toute vaporisation ou débordement qui pourrait entraîner une contamination croisée. Eliminer soigneusement l'humidité excédentaire avec un buvard.
- 5.3.4. Poser les lames sur du papier humide. Couvrir les fenêtres de test avec du conjugué FITC à la dilution utilisée lors du titrage. La quantité de conjugué appliquée sur les fenêtres doit être identique à la quantité d'anticorps utilisée.
- 5.3.5. Incuber les lames sur du papier humide sous un couvercle pendant 30 minutes à la température ambiante (18-25 °C).
- 5.3.6. Eliminer les gouttelettes de conjugué de la lame. Rincer et laver comme indiqué ci-dessus (5.3.3). Enlever soigneusement l'humidité excédentaire.
- 5.3.7. Déposer à la pipette 5 à 10 µl d'un tampon phosphaté 0,1 M au glycérol (appendice 4) ou un support antidécoloration commercial sur chaque fenêtre et recouvrir d'une lamelle.

5.4. Lecture du test d'immunofluorescence:

- 5.4.1. Examiner les lames de test avec un microscope équipé d'une source lumineuse épifluorescente et de filtres adaptés pour travailler avec l'isothiocyanate de fluorescéine, sous l'huile ou l'eau, à 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 ou ne présentant qu'un faible nombre de cellules, observer au moins 40 champs microscopiques.
Commencer par contrôler la lame témoin positif. Les cellules doivent présenter une fluorescence vive et être complètement colorées au titre d'anticorps ou à la dilution de travail déterminés. Le test IF (section VI.A.5) doit être recommencé si la coloration n'est pas bonne.
- 5.4.2. Rechercher la présence de cellules présentant une fluorescence vive, ayant une morphologie caractéristique de *R. solanacearum* dans les fenêtres de test des lames (voir site web <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). L'intensité de fluorescence doit être équivalente à celle de la souche témoin positif pour une dilution d'anticorps identique. Les cellules dont la coloration est incomplète ou dont la fluorescence est faible ne doivent pas être prises en considération.
En cas de soupçon d'une contamination, le test doit être recommencé. Ce 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.
- 5.4.3. Il existe un certain nombre de problèmes inhérents à la spécificité du test d'immunofluorescence. Des populations de cellules fluorescentes morphologiquement atypiques et de bactéries saprophytes provoquant des réactions croisées d'une taille et d'une morphologie similaires à *R. solanacearum* sont susceptibles d'apparaître dans des extraits concentrés de talons de pommes de terre et dans des segments de tiges.

5.4.4. Seules les cellules fluorescentes dont la taille et la morphologie sont caractéristiques au titre ou à la dilution de travail des anticorps visés au point 5.3 doivent être prises en considération.

5.4.5. Interprétation du test IF:

- i) Si l'échantillon contient des cellules avec une fluorescence vive et une morphologie caractéristique, estimer le nombre moyen de cellules typiques par champ microscopique et calculer le nombre de cellules typiques par ml d'extrait concentré remis en suspension (appendice 5).

La lecture du test d'immunofluorescence est considérée comme positive pour les échantillons contenant au moins 5×10^3 cellules typiques par ml d'extrait concentré remis en suspension. L'échantillon est considéré comme potentiellement contaminé et un nouveau test est requis.

- ii) La lecture du test d'immunofluorescence est considérée comme négative pour les échantillons contenant moins de 5×10^3 cellules par ml d'extrait concentré remis en suspension et l'échantillon est considéré comme négatif. De nouveaux tests ne sont pas obligatoires.

6. TESTS PCR

Principes

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

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

*N.B.: Les tests préliminaires réalisés suivant cette méthode doivent permettre une détection reproductible de 10^3 à 10^4 cellules/ml de *R. solanacearum* 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 (voir appendice 6). Sélectionner de préférence une méthode avec contrôle interne.

Prendre les précautions nécessaires pour éviter la contamination de l'échantillon avec de l'ADN cible. Le test PCR devrait être réalisé par des techniciens expérimentés dans des laboratoires de biologie moléculaire spécialisés, afin de réduire autant que possible la possibilité de contamination avec de l'ADN cible.

Des témoins négatifs (pour les procédures d'extraction d'ADN et PCR) devraient toujours être traités comme échantillon final dans la procédure, afin de faire apparaître si un transfert d'ADN est intervenu.

Les témoins négatifs suivants devraient être inclus dans le test PCR:

- Extrait d'échantillon ayant produit précédemment des résultats négatifs pour *R. solanacearum*
- Tampons témoins utilisés pour extraire la bactérie et l'ADN de l'échantillon
- Mélange réactif pour la PCR

Les témoins positifs suivants devraient être inclus:

- Des aliquotes d'extraits concentrés remis en suspension auxquels *R. solanacearum* a été ajouté (préparation: voir appendice 3 B).
- Une suspension de 10^6 cellules/ml d'un isolat virulent de *R. solanacearum* dans l'eau (ex.: NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; voir appendice 3B).
- Si possible, utiliser aussi de l'ADN extrait d'échantillons témoins positifs dans le test PCR.

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

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

Les matériels de contrôle normalisés positifs et négatifs disponibles pour une utilisation avec ce test sont énumérés à l'appendice 3.

6.1. Méthodes de purification de l'ADN

Utiliser des échantillons de contrôle positifs et négatifs selon la méthode décrite ci-dessus (voir appendice 3).

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

Il existe toute une série de méthodes pour purifier l'ADN cible à partir de substrats d'échantillons complexes, ce qui élimine les inhibiteurs de la PCR et d'autres réactions enzymatiques et concentre l'ADN cible dans l'extrait d'échantillon. La méthode suivante a été optimisée pour une utilisation avec les méthodes PCR validées indiquées 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 au bain-marie à 95 °C pendant 10 minutes.
3. Déposer le tube sur de la glace pendant 5 minutes.
4. Ajouter 80 µl de solution concentrée de lysozyme (50 mg de lysozyme par ml dans 10 mM Tris- HCl, pH 8,0) et incubé à 37 °C pendant 30 minutes.
5. Ajouter 220 µl de solution A d'Easy DNA® (Invitrogen), bien mélanger en homogénéisant au vortex et incubé à 65 °C pendant 30 minutes.
6. Ajouter 100 µl de solution B d'Easy DNA® (Invitrogen), homogénéiser vigoureusement au vortex jusqu'à ce que le précipité circule librement dans le tube et que l'échantillon soit uniformément visqueux.
7. Ajouter 500 µl de chloroforme et homogénéiser au vortex jusqu'au moment où la viscosité diminue et où le mélange est 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 ml d'éthanol à 100 % (- 20 °C), homogénéiser brièvement au vortex et 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 concentré à l'air libre ou dans un speedvac ADN.
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. Entreposer à -20 °C jusqu'au moment où l'extrait est requis pour la PCR.
17. Isoler tout précipité blanc par centrifugation et utiliser 5 µl de liquide surnageant contenant l'ADN pour la PCR.

6.1. b) Autres méthodes

D'autres méthodes d'extraction de l'ADN, p. ex.: Qiagen DNeasy Plant Kit, pourraient être appliquées, à condition qu'elles soient d'une efficacité équivalente pour purifier l'ADN d'échantillons témoins contenant 10^3 à 10^4 cellules pathogènes par ml.

6.2. PCR

- 6.2.1. Préparer les matrices de test et de contrôle pour la PCR suivant les protocoles validés (section VI.A.6.). Préparer une dilution au dixième de l'extrait d'échantillon d'ADN (1:10 dans de l'eau ultrapure).
- 6.2.2. Préparer le mélange réactif approprié destiné à la PCR dans un environnement exempt de contamination suivant les protocoles publiés (appendice 6). Lorsque c'est possible, il est recommandé d'utiliser un protocole PCR multiplex qui intègre également un contrôle interne de la PCR.
- 6.2.3. Ajouter 2 à 5 µl d'extrait d'ADN par 25 µl de milieu réactif PCR dans des tubes PCR stériles suivant les protocoles PCR (voir appendice 6).
- 6.2.4. Incorporer un échantillon témoin négatif ne contenant que le mélange réactif pour PCR et ajouter la même source d'eau ultrapure que celle utilisée dans le mélange pour PCR à la place de l'échantillon.
- 6.2.5. Placer les tubes dans le même thermocycleur que celui utilisé lors du test préliminaire et lancer le programme PCR optimisé comme il convient (appendice 6).

6.3. Analyse du produit de la réaction PCR

- 6.3.1. Décoder les amplimères PCR par électrophorèse sur gel d'agarose. Mettre sous 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 associés à 3 µl de tampon de lest (appendice 6) sur des gels d'agarose à 2,0 % dans un tampon tris-acétate-EDTA (TAE) (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 5 mg/l) pendant une durée de 30 à 60 minutes, en prenant les **précautions qui s'imposent pour la manipulation de cet agent mutagène.**

- 6.3.3. Dans le cas des produits PCR amplifiés présentant la taille attendue (appendice 6), visualiser le gel coloré par diaphanoscopie sous lumière ultraviolette ondes courtes ($\lambda = 302 \text{ nm}$) et noter les résultats.
- 6.3.4. Pour tous les nouveaux cas ou constatations, vérifier l'authenticité de l'amplimère PCR 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 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'amplimère PCR spécifique de *R. solanacearum* de la taille attendue n'est pas détecté pour l'échantillon concerné, mais bien pour l'ensemble des échantillons témoins positifs (dans le cas d'une PCR multiplex avec des 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'amplimère PCR spécifique de *R. solanacearum* de la taille et du type de restriction (lorsqu'il est requis) attendus est détecté, à condition qu'il ne soit pas amplifié par l'un des échantillons témoins négatifs. Une confirmation fiable du résultat positif peut également être obtenue en recommençant le test avec une deuxième série d'amorces PCR (appendice 6).

N.B.: Une inhibition de la PCR peut être soupçonnée dans le cas où l'amplimère prévu est obtenu de l'échantillon témoin positif contenant R. solanacearum dans de l'eau et où des résultats négatifs sont obtenus de témoins positifs avec R. solanacearum dans de l'extrait de pomme de terre. Dans les protocoles PCR multiplex avec contrôle interne de la PCR, l'inhibition de la réaction est indiquée quand aucun des deux amplimères n'est obtenu.

La contamination peut être suspectée si l'amplimère attendu est obtenu d'un ou de plusieurs témoins négatifs.

7. TEST FISH0

Principe

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

N.B.: Utiliser des oligosondes validées spécifiques de R. solanacearum (voir appendice 7). Les tests préliminaires réalisés suivant cette méthode doivent permettre une détection reproductible de 10^3 à 10^4 cellules/ml de R. solanacearum 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'extraits d'échantillon ayant préalablement produit un résultat négatif lors de tests de recherche de *R. solanacearum*.

A titre de témoins positifs, préparer des suspensions contenant entre 10^5 et 10^6 cellules/ml du biovar 2 de *R. solanacearum* (p. ex.: la souche NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857, voir appendice 3) dans un tampon phosphaté 0,01 M (PB), à partir d'une culture de trois à cinq jours. Préparer des lames témoins positifs séparées de la souche homologue ou de toute autre souche de référence de *R. solanacearum*, en suspension dans l'extrait de pomme de terre, comme indiqué à l'appendice 3 B.

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

Les matériaux témoins positifs et négatifs normalisés disponibles pour ce test sont énumérés à l'appendice 3 A. Tester le matériau témoin de la même façon que les échantillons.

7.1. Fixation de l'extrait de pomme de terre

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

7.1.1. Préparer la solution de fixation (voir appendice 7).

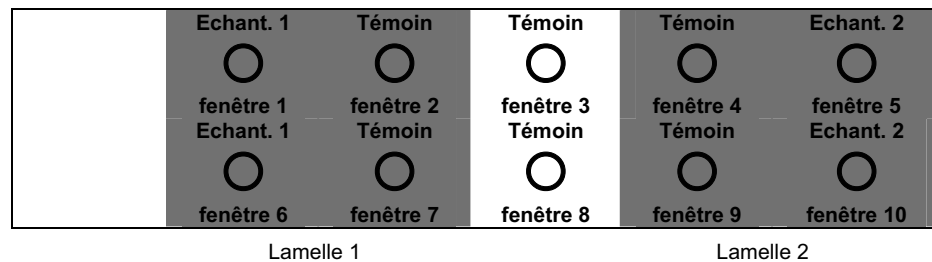
7.1.2. Introduire à la pipette 100 μl de chaque extrait d'échantillon dans un tube Eppendorf et centrifuger pendant 7 minutes à 7 000 g.

7.1.3. Eliminer le surnageant et dissoudre l'extrait concentré dans 200 μl de fixatif préparé moins de 24 heures auparavant. Homogénéiser au vortex et laisser incubé pendant 1 heure au réfrigérateur.

7.1.4. Centrifuger pendant 7 minutes à 7 000 g, éliminer le surnageant et remettre l'extrait concentré en suspension dans 75 μl de PB 0,01 M (voir appendice 7).

- 7.1.5. Déposer 16 µl des suspensions fixées sur une lame multitest propre comme indiqué à la figure 7.1. Sur chaque lame, appliquer deux échantillons différents, non dilués, et en diluer 10 µl à 1:100 (dans un tampon phosphaté 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 ajouter un volume équivalent de tampon phosphaté 0,01 M (mélanger au vortex).

Figure 7.1 - Disposition d'une lame pour le test FISH



- 7.1.6. 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.

7.2. Hybridation

- 7.2.1. 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.
- 7.2.2. 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 appendice 7). Faire préincuber la boîte pendant au moins 10 minutes dans le four à hybridation à une température de 45 °C.
- 7.2.3. Verser 10 µl de solution d'hybridation (appendice 7) sur huit fenêtres (fenêtres 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 et 10; voir fig. 7.1) de chaque lame en laissant vides les deux fenêtres du centre (3 et 8).
- 7.2.4. Couvrir de lamelles (24 x 24 mm) la première et les quatre dernières fenêtres en prenant soin de ne pas emprisonner d'air. Placer les lames dans la chambre humide préchauffée et les laisser pendant 5 heures dans le four à 45 °C, dans l'obscurité, pour permettre le déroulement de l'hybridation.
- 7.2.5. Préparer trois béchers contenant 1 l d'eau Milli Q (biologie moléculaire), 1 l d'hybmix 1X [334 ml d'hybmix 3X et 666 ml d'eau Milli Q (biologie moléculaire)] et 1 l d'hybmix 1/8X [(42 ml d'hybmix 3X et 958 ml d'eau Milli Q (biologie moléculaire))]. Faire préincuber chacun de ces béchers au bain-marie à 45 °C.
- 7.2.6. Débarrasser les lames des lamelles et les placer sur un porte-lames.
- 7.2.7. Éliminer l'excédent d'échantillon en incubant pendant 15 minutes à 45 °C dans le bécher contenant l'hybmix 1X.
- 7.2.8. Transférer le porte-lames dans une solution de lavage à l'hybmix 1/8X et laisser incubé pendant 15 minutes supplémentaires.
- 7.2.9. Plonger brièvement les lames dans un bain d'eau Milli Q et les placer sur un papier filtre. Éliminer l'humidité excédentaire en disposant doucement du papier filtre sur la surface à sécher. Verser à la pipette sur chaque fenêtre entre 5 et 10 µl de solution support anti-décoloration (p. ex.: Vectashield de Vecta Laboratories, CA, USA, ou équivalent) et couvrir toute la surface de la lame d'une grande lamelle (24 x 60 mm).

7.3. Lecture du test FISH

- 7.3.1. 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 au tétraméthylrhodamine 5 isothiocyanate, les cellules de *R. solanacearum* 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. Le test FISH (section VI.A.7) doit être recommencé si la coloration n'est pas bonne. 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.
- 7.3.2. Rechercher la présence de cellules présentant une fluorescence vive, ayant une morphologie caractéristique de *R. solanacearum* dans les fenêtres de test des lames (voir site web <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). L'intensité de fluorescence doit être équivalente à celle de la souche témoin positif ou doit être meilleure. Les cellules dont la coloration est incomplète ou qui présentent une faible fluorescence ne doivent pas être prises en considération.

- 7.3.3. Au moindre soupçon de contamination, le test doit être recommencé. Ce 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.
- 7.3.4. Il existe un certain nombre de problèmes inhérents à la spécificité du test FISH. Des populations de cellules fluorescentes morphologiquement atypiques et de bactéries saprophytes provoquant des réactions croisées d'une taille et d'une morphologie similaires à *R. solanacearum* sont susceptibles d'apparaître dans des extraits concentrés de talons de pommes de terre et des segments de tiges, même si cela est beaucoup moins fréquent que dans le test IF.
- 7.3.5. Seules les cellules fluorescentes dont la taille et la morphologie sont caractéristiques doivent être prises en considération.
- 7.3.6. Interprétation du résultat du test FISH
- i) Des résultats valides du test FISH sont obtenus si des cellules présentant une fluorescence vive de couleur verte de la taille et de la morphologie caractéristiques de *R. solanacearum* sont observées 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 avec une fluorescence vive et une morphologie caractéristique, estimer le nombre moyen de cellules typiques par champ microscopique et calculer le nombre de cellules typiques par ml d'extrait concentré remis en suspension (appendice 4). Les échantillons contenant au moins 5×10^3 cellules typiques par ml d'extrait concentré remis en suspension sont considérés comme potentiellement contaminés. Il convient de poursuivre les tests. Les échantillons contenant moins de 5×10^3 cellules typiques par ml d'extrait concentré remis en suspension sont considérés comme négatifs.
 - ii) Le test FISH est négatif si des cellules présentant une fluorescence vive de couleur rouge, de la taille et de la morphologie caractéristiques de *R. solanacearum*, ne sont pas observées en utilisant le filtre rhodamine, pour autant que des cellules présentant une fluorescence vive de couleur rouge soient observées dans les préparations de témoins positifs lors de l'utilisation du filtre rhodamine.

8. TESTS ELISA

Principe

ELISA ne peut être utilisé que comme un test facultatif en plus des tests IF, PCR ou FISH en raison de sa sensibilité relativement faible. Lorsque la méthode DAS-ELISA est employée, l'enrichissement et l'utilisation d'anticorps monoclonaux sont obligatoires (voir site web <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). L'enrichissement des échantillons avant l'utilisation d'ELISA peut être utile afin d'accroître la sensibilité du test, mais il peut échouer en raison de la concurrence d'autres organismes dans l'échantillon.

NB: Utiliser une source validée d'anticorps de *R. solanacearum* (voir site web <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). 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 10^5 et 10^6 cellules/ml de la souche homologue de *R. solanacearum* en utilisant des conjugués d'anticorps secondaires appropriés, conformément aux recommandations du fabricant. Pendant le test, la dilution de travail des anticorps doit être approximativement égale ou égale à celle du titre de la formule commerciale.

Déterminer le titre des anticorps sur une suspension de 10^5 à 10^6 cellules/ml de la souche homologue de *R. solanacearum*.

Inclure un extrait d'échantillon ayant donné précédemment des résultats négatifs pour *R. solanacearum* et une suspension d'une bactérie ne provoquant pas une réaction croisée dans un tampon au phosphate (PBS) comme témoins négatifs.

Comme témoin positif, utiliser des aliquotes d'extraits d'échantillons qui ont donné précédemment des résultats négatifs, mélangées avec 10^3 à 10^4 cellules/ml du biovar 2 de *R. solanacearum* (p. ex.: la souche NCPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857, voir appendices 2 A et B). Pour comparer les résultats de chaque boîte, utiliser une suspension standard de 10^5 à 10^6 cellules/ml dans du PBS de *R. solanacearum*. Faire en sorte que les témoins positifs soient bien séparés sur la plaque de microtitrage de l'échantillon ou des échantillons faisant l'objet du test.

Les matériaux témoins positifs et négatifs normalisés disponibles pour une utilisation avec ce test sont énumérés à l'appendice 3 A.

Tester le matériau témoin de la même façon que les échantillons.

Deux protocoles ELISA ont été validés.

8. a) ELISA indirect (Robinson Smith et al., 1995)

1. Utiliser des aliquotes de 100.200 µl d'extrait d'échantillon. (Chauffer à 100 °C pendant 4 minutes au bain-marie ou dans un bloc chauffant peut réduire des résultats non spécifiques dans certains cas).
2. Ajouter un volume identique de tampon concentré deux fois (appendice 4) et homogénéiser au vortex.

3. Déposer des aliquotes de 100 µl sur au moins deux puits de la plaque de microtitrage (p. ex.: Nunc-Polysorp ou équivalent) et incuber une heure à 37 °C ou une nuit à 4 °C.
4. Éliminer les extraits des puits. Laver les puits à trois reprises au PBS-Tween (appendice 4) en laissant la dernière solution de lavage dans les puits pendant au moins 5 minutes.
5. Préparer la dilution appropriée d'anticorps anti-*R. solanacearum* dans le tampon de saturation (appendice 4). Pour les anticorps commerciaux validés, utiliser les dilutions recommandées (habituellement deux fois plus concentrées que le titre).
6. Ajouter 100 µl à chaque puits et incuber pendant 1 heure à 37 °C.
7. Éliminer la solution d'anticorps des puits et laver comme indiqué auparavant (point 4).
8. Préparer la dilution appropriée de conjugués secondaires d'anticorps et de phosphatase alcaline dans le tampon de saturation. Ajouter 100 µl à chaque puits et incuber pendant 1 heure à 37 °C.
9. Éliminer le conjugué d'anticorps des puits et laver comme indiqué auparavant (point 4).
10. Ajouter 100 µl de solution du substrat de la phosphatase alcaline (appendice 4) à chaque puits. Incuber dans l'obscurité à température ambiante et mesurer l'absorbance à 405 nm à intervalles réguliers dans un délai de 90 minutes.

8. b) DAS ELISA

1. Préparer la dilution appropriée d'immunoglobulines polyclonales anti-*R. solanacearum* dans le tampon concentré de pH 9,6 (appendice 4). Ajouter 200 µl à chaque puits. Incuber à 37 °C pendant 4 à 5 heures ou à 4 °C pendant 16 heures.
2. Laver les puits trois fois au PBS-Tween (appendice 4).
Ajouter 190 µl d'extrait d'échantillon à deux puits au moins. Ajouter également des témoins positifs et négatifs à deux puits par boîte. Incuber pendant 16 heures à 4 °C.
3. Laver les puits trois fois au PBS-Tween (appendice 4).
4. Préparer une dilution appropriée d'anticorps monoclonaux spécifiques de *R. solanacearum* dans du PBS (appendice 4) contenant également 0,5 % de sérum albumine bovine (BSA) et ajouter 190 µl à chaque puits. Incuber à 37 °C pendant 2 heures.
5. Laver les puits trois fois au PBS-Tween (appendice 4).
6. Préparer une dilution appropriée d'immunoglobulines antisouris conjuguées à de la phosphatase alcaline dans du PBS. Ajouter 190 µl à chaque puits. Incuber à 37 °C pendant 2 heures.
7. Laver les puits trois fois au PBS-Tween (appendice 4).
8. Préparer une solution du substrat de la phosphatase alcaline contenant 1 mg de p-nitrophényl phosphate par ml de substrat tamponné (appendice 4). Ajouter 200 µl à chaque puits. Incuber dans l'obscurité à température ambiante et mesurer l'absorbance à 40 nm à intervalles réguliers dans un délai de 90 minutes.

Interprétation des résultats des tests ELISA:

Le test ELISA est négatif si la densité optique (DO) moyenne des puits du double de l'échantillon est inférieure au double de celle du puits du témoin de l'extrait d'échantillon négatif, pour autant que la DO pour les témoins positifs soit toujours supérieure à 1,0 (après 90 minutes d'incubation avec le substrat) et soit supérieure à deux fois la DO obtenue pour les extraits d'échantillons négatifs.

Le test ELISA est positif si la densité optique (DO) moyenne des puits du double de l'échantillon est supérieure au double de celle du puits de l'extrait d'échantillon négatif, pour autant que la DO pour tous les puits des témoins négatifs soit inférieure à deux fois la DO obtenue dans les puits des témoins positifs.

Une lecture ELISA négative dans les puits des témoins positifs indique que le test n'a pas été réalisé correctement ou qu'il a été inhibé. Une lecture ELISA positive dans les puits des témoins négatifs indique une contamination croisée ou une liaison d'anticorps non spécifique.

9. TEST BIOLOGIQUE

*N.B.: Les tests préliminaires réalisés suivant cette méthode doivent permettre une détection reproductible de 10^3 à 10^4 unités formant des colonies de *R. solanacearum* par ml ajoutées aux extraits d'échantillons ayant donné antérieurement des résultats négatifs (préparation: voir appendice 3).*

Le degré de sensibilité le plus élevé pour la détection peut être attendu en utilisant un extrait d'échantillon fraîchement préparé et dans des conditions de croissance optimales. Toutefois, la méthode peut être appliquée avec succès aux extraits qui ont été entreposés dans du glycérol entre -68 et -86 °C.

Le protocole suivant est basé sur celui de Janse (1988):

- 9.1. Utiliser dix plantes tests d'un cultivar de tomate sensible (p. ex.: Moneymaker ou cultivar d'une sensibilité équivalente déterminée par le laboratoire d'essai) au stade de la troisième vraie feuille de chaque échantillon. Pour les détails de la culture, voir appendice 8. Il est également possible d'utiliser des aubergines (p. ex: Black Beauty ou cultivars d'une sensibilité équivalente) en ne choisissant que des plants au stade de la deuxième ou troisième feuille jusqu'au développement complet de la troisième vraie feuille.

Cependant, il est apparu que les symptômes sont moins graves et se développent plus lentement sur les aubergines. Si possible, il est donc recommandé d'utiliser des plantules de tomates.

9.2. Répartir 100 µl d'extrait entre les plantes tests.

9.2.1. Inoculation par injection

Avec une seringue munie d'une aiguille hypodermique (pas moins de 23G), pratiquer l'inoculation dans les tiges de la plante juste au-dessus des cotylédons. Répartir l'échantillon entre les plantes tests.

9.2.2. Inoculation par incision

Tenir la plante 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.

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.

Refermer l'incision avec de la vaseline stérile au moyen d'une seringue.

9.3. Inoculer par la même technique cinq plantules avec une suspension aqueuse de 10^5 à 10^6 cellules/ml préparée à partir d'une culture de 48 heures d'une souche virulente du biovar 2 de *R. solanacearum* comme témoin positif et avec un tampon concentré (appendice 4) comme témoin négatif. Séparer les plantes témoins positifs et négatifs des autres plantes pour éviter des contaminations croisées.

9.4. Cultiver les plantes tests dans des installations de quarantaine pendant une durée allant jusqu'à 4 semaines à 25-30°C et dans une humidité relative élevée en assurant un arrosage approprié pour prévenir un engorgement hydrique ou un flétrissement par manque d'eau. Pour éviter une contamination, incuber les plantes témoins positifs et négatifs sur des bancs nettement séparés dans une serre ou une chambre de culture ou, au cas où l'espace serait limité, veiller à une stricte séparation entre les traitements. Si les plantes de différents échantillons doivent incuber à proximité les uns des autres, prévoir une séparation entre elles avec des écrans appropriés. Lors de la fertilisation, de l'arrosage, de l'inspection ou de toute autre manipulation, veiller soigneusement à éviter une contamination croisée. Il est essentiel de maintenir les serres et chambres de culture exemptes d'insectes étant donné qu'ils peuvent transmettre la bactérie d'échantillon à échantillon.

Observer l'apparition des symptômes du flétrissement: épinastie, chlorose et/ou rabougrissement.

9.5. Isoler les plantes infectées (section II.3.) et identifier les cultures purifiées de *R. solanacearum* supposé (section VI.B.).

9.6. Si aucun symptôme n'est observé après trois semaines, effectuer un IF/PCR/isolément sur un échantillon composite de morceaux de tiges de 1 cm provenant de chaque plante test et prélevés au-dessus du point d'inoculation. Si le test est positif, effectuer un test par dilution et étalement (section 4.1).

9.7. Identifier toute culture purifiée de *R. solanacearum* supposé (section VI.B.).

Interprétation des résultats du test biologique

Des résultats valides du test biologique sont obtenus lorsque les plantes témoins positifs présentent des symptômes typiques, les bactéries peuvent être isolées une nouvelle fois sur ces plantes et aucun symptôme n'est observé sur les témoins négatifs.

Le test biologique est négatif si les plantes tests ne sont pas infectées par *R. solanacearum* et sous réserve que *R. solanacearum* soit détecté sur les témoins positifs.

Le test biologique est positif si les plantes tests sont infectées par *R. solanacearum*.

B. TESTS D'IDENTIFICATION

Identifier des cultures pures supposées de *R. solanacearum* en utilisant au moins deux des tests suivants fondés sur des principes biologiques différents.

Inclure des souches de référence connues, le cas échéant, pour chaque test réalisé (voir appendice 3.)

1. TESTS D'IDENTIFICATION NUTRITIONNELS ET ENZYMATIQUES

Déterminer les caractéristiques phénotypiques suivantes, systématiquement présentes ou absentes chez *R. solanacearum*, suivant les méthodes de Lelliott et Stead (1987), Klement et al. (1990), et Schaad (2001).

Test	Résultats attendus
Production de pigments fluorescents	—
Inclusions de poly-β-hydroxybutyrate	+
Test d'oxydation/fermentation (O/F)	O+/F—
Activité de la catalase	+
Test de l'oxydase de Kovac	+
Réduction du nitrate	+

Utilisation du citrate	+
Croissance à 40 °C	—
Croissance dans du NaCl à 1 %	+
Croissance dans du NaCl à 2 %	—
Activité de la dihydrolase d'arginine	—
Liquéfaction de la gélatine	—
Hydrolyse de l'amidon	—
Hydrolyse de l'esculine	—
Production de lévane	—

2. TEST IF

- 2.1. Préparer une suspension d'environ 10^6 cellules/ml dans un tampon d'immunofluorescence (appendice 4).
- 2.2. Préparer une série de dilutions au demi d'un antisérum approprié (voir site web <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).
- 2.3. Suivre la procédure du test IF (section VI.A.5).
- 2.4. Pour qu'un test IF soit positif, le titre obtenu avec la culture en immunofluorescence doit être équivalent à celui obtenu avec le témoin positif.

3. TEST ELISA

NB: En cas de réalisation de deux tests d'identification seulement, ne pas utiliser d'autre test sérologique en plus de cette méthode.

- 3.1. Préparer une suspension d'environ 10^8 cellules/ml dans du PBS 1X (appendice 4).
- 3.2. Effectuer une procédure ELISA appropriée avec un anticorps monoclonal spécifique de *R. solanacearum*.
- 3.3. Un test ELISA est positif si la lecture ELISA obtenue de la culture est au moins égale à la moitié de celle obtenue pour le témoin positif.

4. TESTS PCR

- 4.1. Préparer une suspension d'environ 10^6 cellules/ml dans de l'eau stérile pour biologie moléculaire.
- 4.2. Chauffer 100 µl de la suspension dans des tubes fermés dans un bloc chauffant ou au bain-marie bouillant à 100 °C pendant 4 minutes. Les échantillons peuvent ensuite être stockés entre -16 et -24 °C jusqu'au moment où ils sont requis.
- 4.3. Appliquer des procédures PCR appropriées pour amplifier les amplimères spécifiques de *R. solanacearum* [voir p. ex.: Seal et al. (1993), Pastrik & Maiss (2000), Pastrik et al. (2002), Boudazin et al. (1999), Opina et al. (1997), Weller et al. (1999)].
- 4.4. Une identification positive de *R. solanacearum* est obtenue si les amplimères PCR sont de la même taille et présentent les mêmes polymorphismes de taille des fragments de restriction que dans le cas de la souche témoin positif.

5. TEST FISH

- 5.1. Préparer une suspension d'environ 10^6 cellules/ml dans de l'eau ultrapure.
- 5.2. Appliquer la procédure FISH (section VI.A.7.) avec au moins deux oligosondes spécifiques de *R. solanacearum* (appendice 7).
- 5.3. Un test FISH est positif si les mêmes réactions sont obtenues de la culture et du témoin positif.

6. TEST DE PROFIL DES ACIDES GRAS (FAP)

- 6.1. Cultiver la culture pendant 48 heures à 28 °C sur des boîtes de gélose trypticase-soja (Oxoid).
- 6.2. Appliquer une procédure de test FAP appropriée (Janse, 1991; Stead, 1992).
- 6.3. 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 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH et 18:1 2OH et l'absence de 16:0 3OH sont très indicatives de *Ralstonia* sp.

7. METHODES DE CARACTERISATION DE LA SOUCHE

Une caractérisation de la souche utilisant l'une des méthodes suivantes est recommandée pour chaque nouveau cas d'isolement de *R. solanacearum*.

Inclure des souches de référence connues, le cas échéant, pour chaque test réalisé (voir appendice 3.)

7.1. Détermination du biovar

On distingue différents biovars de *R. solanacearum* en fonction de leur aptitude à utiliser et/ou à oxyder trois disaccharides et trois hexoses alcools (Hayward, 1964, et Hayward et al., 1990). Les milieux de croissance pour le test du biovar sont décrits à l'appendice 2. Le test peut être valablement réalisé en

inoculant par piqûre profonde les milieux avec des cultures pures d'isolats de *R. solanacearum* et en incubant à 28 °C. Si les milieux sont répartis dans 96 puits stériles de boîtes de culture (200 µl par puits), un changement de couleur du vert olive au jaune peut être observé dans les 72 heures, ce qui indique un résultat de test positif.

	Biovar				
	1	2	3	4	5
Utilisation de:					
Maltose	-	+	+	-	+
Lactose	-	+	+	-	+
D (+) Cellobiose	-	+	+	-	+
Mannitol	-	-	+	+	+
Sorbitol	-	-	+	+	-
Dulcitol	-	-	+	+	-

Des tests supplémentaires différencient des sous-phénotypes du biovar 2

	Biovar 2A (Répandu dans le monde)	Biovar 2A (Trouvé au Chili et en Colombie)	Biovar 2T (Trouvé en zone tropicale)
Utilisation de tréhalose	-	+	+
Utilisation de méso-inositol	+	-	+
Utilisation de D ribose	-	-	+
Activité pectolytique ¹	faible	faible	élevée

¹ Voir Lelliott & Stead (1987).

7.2. Empreinte génomique

Les procédés suivants permettent de réaliser une différenciation moléculaire des souches à l'intérieur du complexe *R. solanacearum*:

- 7.2.1. Analyse du polymorphisme de taille des fragments de restriction (PTFR) (Cook et al., 1989).
- 7.2.2. PCR sur des séquences répétitives utilisant des amorces (REP, BOX et ERIC (Louws et al., 1995, Smith et al., 1995)).
- 7.2.3. Analyse du polymorphisme de taille des fragments de restriction amplifiés (Van der Wolf et al., 1998).

7.3. Méthodes PCR

Des amorces PCR spécifiques (Patrik et al., 2002; voir appendice 6) peuvent être utilisées pour différencier des souches appartenant à la division 1 (biovars 3, 4 et 5) et à la division 2 (biovars 1, 2A et 2T) de *R. solanacearum*, telles que définies initialement par l'analyse du PTFR (Cook et al., 1989) et la séquence 16S d'ADNr (Taghavi et al., 1996).

C. TEST DE CONFIRMATION

Le test de pathogénicité doit être effectué en tant que confirmation finale d'un diagnostic de *R. solanacearum* et pour évaluer la virulence de cultures identifiées comme étant de *R. solanacearum*.

1. Préparer un inoculum d'environ 10⁶ cellules/ml à partir d'une culture de 24 à 48 heures de l'isolat à tester et d'une souche témoin positif appropriée de *R. solanacearum* (p. ex.: NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857, voir appendice 3).
2. Inoculer cinq à dix plantules de tomates ou d'aubergines sensibles au stade de la troisième vraie feuille (voir section VI.A.9).
3. Incuber jusqu'à deux semaines à 25-28 °C et dans une humidité relative élevée en assurant un arrosage approprié pour prévenir un engorgement hydrique ou le stress de sécheresse. Avec des cultures pures, un flétrissement typique devrait apparaître dans les quinze jours. En l'absence de symptômes à l'issue de cette période, la culture ne peut pas être confirmée comme étant une forme pathogène de *R. solanacearum*.
4. Observer l'apparition de symptômes de flétrissement et/ou d'épinastie, de chlorose et de rabougrissement.
5. Isoler les plantes symptomatiques en prélevant une section de tige environ 2 cm au-dessus du point d'inoculation. Réduire et mettre en suspension dans un petit volume d'eau stérile distillée ou de tampon phosphaté 50 mM (appendice 4). Isoler de la suspension par dilution sur un milieu approprié, de préférence sur un milieu sélectif (appendice 2), incubé pendant 48 à 72 heures à 28 °C et observer la formation de colonies typiques de *R. solanacearum*.

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	Lynby	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	Le Rheu	France
Station de quarantaine de la pomme de terre		
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Allemagne
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Allemagne
State Laboratory	Dublin	Irlande
Dipartimento di Scienze e Tecnologia Agroambientali	Bologne	Italie
Regione Veneto Unità Periferica per i Servizi Fitosanitari	Vérone	Italie
Nederlandse Algemene Keuringsdienst	Emmeloord	Pays-Bas
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Pays-Bas
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lisbonne	Portugal
Centro Diagnostico de Aldearrubia	Salamanque	Espagne
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias	Valencia	Espagne
Swedish University of Agricultural Sciences	Uppsala	Suède

¹ Experts de contact: voir site Web <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

Appendice 2

Milieux d'isolement et de culture de *R. solanacearum*

a) Milieux de croissance en général

Gélose nutritive (NA)

Gélose nutritive (Difco) 23,0 g

Eau distillée 1,0 l

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

Gélose au levure-peptone-glucose (YPGA)

Extrait de levure (Difco) 5,0 g

Bacto-Peptone (Difco) 5,0 g

D(+)-glucose (monohydraté) 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.

Gélose à la saccharose-peptone (SPA)

Saccharose 20,0 g

Bacto-Peptone (Difco) 5,0 g

K₂HPO₄ 0,5 g

MgSO₄·7H₂O 0,25 g

Bacto-Agar (Difco) 15,0 g

Eau distillée 1,0 l

pH 7,2 - 7,4

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

Milieu tétrazolium de Kelman

Acides casaminiques (Difco)	1,0 g
Bacto-Peptone (Difco)	10,0 g
Dextrose	5,0 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.

Refroidir à 50 °C et ajouter une solution de chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium (Sigma), stérilisée par filtration, pour obtenir une concentration finale de 50 mg par litre.

b) Milieux de croissance sélectifs validés

Milieu SMSA (Englebrecht, 1994, modifié par Elphinstone et al., 1996)

Milieu de base

Acides casaminiques (Difco)	1,0 g
Bacto-Peptone (Difco)	10,0 g
Glycérol	5,0 ml
Bacto-Agar (Difco) (<i>voir note 2</i>)	15,0 g
Eau distillée	1,0 l

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

Refroidir à 50 °C et ajouter des solutions aqueuses concentrées, stérilisées par filtration, des ingrédients suivants pour obtenir les concentrations finales spécifiées:

Violet cristallisé (Sigma)	5 mg par l
Sulfate de polymyxine-B	(Sigma P-1004) 600 000 U (environ 100 mg) par l
Bacitracine (Sigma B-0125)	1250 U (environ 25 mg) par l
Chloramphénicol (Sigma C-3175)	5 mg par l
Pénicilline-G (Sigma P-3032)	825 U (environ 0,5 mg) par l
Chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium (Sigma)	50 mg par l

N.B.:

1. *L'utilisation de réactifs autres que ceux spécifiés ci-dessus peut affecter la croissance de R. solanacearum.*
2. *Oxoid Agar #1 peut être utilisé en lieu et place de Bacto-Agar (Difco). Dans ce cas, la croissance de R. solanacearum sera plus lente, bien que la croissance de saprophytes concurrents puisse également être réduite. Des colonies typiques de R. solanacearum peuvent prendre un à deux jours de plus pour se constituer et la coloration rouge peut être plus légère et plus diffuse que sur Bacto Agar.*
3. *Une augmentation de la concentration de bacitracine à 2 500 U par l peut réduire les populations de bactéries concurrentes sans perturber la croissance de R. solanacearum.*

Stocker les milieux et les solutions concentrées d'antibiotiques à 4 °C dans l'obscurité et les utiliser dans le délai d'un mois.

Les boîtes doivent être exemptes de condensation en surface avant leur utilisation.

Eviter un séchage excessif des boîtes.

Un contrôle de qualité devrait être réalisé après la préparation de chaque nouveau lot de milieu de culture par étalement d'une suspension d'une culture de référence de *R. solanacearum* (voir appendice 3) et par l'observation de la formation de colonies typiques après incubation à 28 °C pendant deux à cinq jours.

c) Milieux d'enrichissement validés

Bouillon SMSA (Elphinstone et al., 1996)

Même préparation que pour le milieu gélosé sélectif SMSA, mais sans Bacto-Agar ni chlorure de 2,3,5-tétrazolium.

Bouillon nutritif modifié de Wilbrink (Caruso et al., 2002)

Saccharose	10 g
Protéose peptone	5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,25 g
NaNO ₃	0,25 g
Eau distillée	1 l

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes et refroidir à 50 °C.

Ajouter des solutions concentrées d'antibiotiques comme pour le bouillon SMSA.

Appendice 3

A. Matériel de contrôle normalisé disponible dans le commerce

a) Isolats de bactéries

Les isolats de bactéries suivants sont recommandés pour une utilisation en tant que matériel de référence standard ou que témoins positifs (tableau 1) ou au cours de l'optimisation des tests pour éviter des réactions croisées (tableau 2). Toutes les souches sont disponibles dans le commerce aux adresses suivantes:

1. National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPBP), Central Science Laboratory, York, UK
2. Culture Collection of the Plant Protection Service (PD), Wageningen, Pays-Bas.
3. Collection française de bactéries phytopathogènes (CFBP), INRA - Station de phytobactériologie, Angers, France.

Tableau 1: gamme de référence SMT d'isolats de *R. solanacearum*

Code NCPBP	SMT #	AUTRE CODE	PAYS D'ORIGINE	Biovar
NCPBP 4153	6	CFBP 4582, Pr 3020, EURS11	Egypte	2
NCPBP 4154	10	CFBP 4585, 550, EURS21	Turquie	2
NCPBP 3857	12	CFBP 4587, Pr 1140, EURS26	Angleterre	2
NCPBP 1584	23	CFBP 4598, EURS49	Chypre	2
NCPBP 2505	24	CFBP 4599, EURS50	Suède	2
NCPBP 4155	26	CFBP 4601, 502, EURS55	Belgique	2
NCPBP 4156*	71*	PD 2762, CFBP 3857	Pays-Bas	2
NCPBP 4157	66	LNPV 15.59	France	2
NCPBP 4158	39	CFBP 4608, Port 448, EURS80, NCPBP 4066	Portugal	2
NCPBP 4160	69	IVIA-1632-2	Espagne	2
NCPBP 4161	76	B3B	Allemagne	2
NCPBP 325	41	CFBP 2047, KEL60-1, R842	Etats-Unis	1
NCPBP 3967	42	CFBP 4610, R285, GONg7	Costa Rica	1
NCPBP 4028	43	CFBP 4611, R303/571 CIP310, SEQ205	Colombie	2
NCPBP 3985	44	CFBP 4612, R578, CIP312	Pérou	2T
NCPBP 3989	45	CFBP 4613, R568, CIP226	Brésil	2T
NCPBP 3996	46	CFBP 3928, R276/355, CIP72, SEQ225	Pérou	3
NCPBP 3997	47	CFBP 4614, R280/363, CIP49, HAY0131a	Australie	3
NCPBP 4029	48	CFBP 4615, R297/349, CIP121, CM1b2861	Sri Lanka	4
NCPBP 4005	49	CFBP 4616, R470	Philippines	4
NCPBP 4011	50	CFBP 4617, R288, HEmps2	Chine	5

* Utilise comme souche de référence standard le biovar 2, race 3 de *R. solanacearum*.

N.B.: L'authenticité des souches susmentionnées ne peut être garantie que si elles sont obtenues d'une collection de cultures authentiques.

Tableau 2: Gamme de référence SMT de bactéries sérologiquement ou génétiquement liées en vue d'une utilisation pour l'optimisation des tests de détection

Code NCPPB	SMT #	AUTRE CODE	IDENTIFICATION
NCPPB 4162	51	CFBP 1954	<i>Bacillus polymyxa</i> ¹
NCPPB 4163	52	CFBP 1538	<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i> ¹
NCPPB 4164	–	CFBP 2227	<i>Burkholderia cepacia</i> ²
NCPPB 4165	–	CFBP 2459	<i>Ralstonia pickettii</i> ²
NCPPB 4166	58	CFBP 3567 CSL Pr1150	<i>Ralstonia pickettii</i> ¹
NCPPB 4167	60	CFBP 4618 PD 2778	<i>Ralstonia</i> sp. ¹
NCPPB 1127	53	CFBP 3575	<i>Burkholderia andropogonis</i> ¹
NCPPB 353	54	CFBP 3572	<i>Burkholderia caryophylli</i> ¹
NCPPB 945	55	CFBP 3569	<i>Burkholderia cepacia</i> ¹
NCPPB 3708	56	CFBP 3574	<i>Burkholderia glumae</i> ¹
NCPPB 3590	57	CFBP 3573	<i>Burkholderia plantarii</i> ¹
NCPPB 3726	59	CFBP 3568	<i>Banana Blood Disease Bacterium</i> ^{1, 2, 3}
NCPPB 4168	61	CFBP 4619 IPO S339	<i>Enterobacter</i> sp. ¹
NCPPB 4169	62	IPO 1695	<i>Enterobacter</i> sp. ¹
NCPPB 4170	63	CFBP 4621 IPO S306	<i>Ochrobactrum anthropi</i> ^{1,2}
NCPPB 4171	64	CFBP 4622 IPO 1693	<i>Curtobacterium</i> sp. ^{1,2}
NCPPB 4172	65	IPO 1696a	<i>Pseudomonas</i> sp. ¹
NCPPB 4173	–	PD 2318	<i>Aureobacterium</i> sp. ²
NCPPB 4174	81	IVIA 1844.06	<i>Flavobacterium</i> sp. ^{1,2}

¹ Souche provoquant potentiellement une réaction croisée dans les tests sérologiques (IF et/ou ELISA) avec les antisérums polyclonaux.

² Souche à partir de laquelle le produit PCR peut être amplifié dans certains laboratoires d'une taille similaire à celle attendue en utilisant les amorces spécifiques OLI-1 et Y-2 (voir appendice 6).

³ Susceptible de provoquer une réaction croisée dans la plupart des tests, mais connue pour n'apparaître que sur les bananes en Indonésie.

b) Matériau témoin normalisé disponible dans le commerce

Le matériau témoin normalisé suivant peut être obtenu auprès de la collection de cultures NCPPB:

Granules lyophilisées d'extrait de 200 tubercules de pomme de terre sains en tant que témoin négatif pour tous les tests.

Granules lyophilisées d'extrait de 200 tubercules de pomme de terre sains contenant de 10³ à 10⁴ et de 10⁴ à 10⁶ cellules du biovar 2 de *R. solanacearum* (p.ex.: souche NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) en tant que témoins positifs pour les tests sérologiques et PCR. Comme la lyophilisation influe sur la viabilité des cellules, celles-ci ne conviennent pas comme témoins standard pour les tests d'isolement ou les tests biologiques.

Suspensions fixées à la formoline du biovar 2 de *R. solanacearum* (souche NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) à 10⁶ cellules/ml en tant que témoins positifs pour les tests sérologiques.

B. Préparation de témoins positifs et négatifs

Produire une culture de 48 heures d'une souche virulente de biovar 2, race 3 de *R. solanacearum* (p. ex. la souche NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) sur un milieu de base SMSA et mettre en suspension dans un tampon phosphaté 10 mM pour obtenir une densité cellulaire d'environ 2x10⁸ ufc/ml. Elle est généralement obtenue par une suspension légèrement turbide équivalente à une densité optique de 0,15 à 600 nm.

Retirer les talons de 200 tubercules prélevés sur une variété à peau blanche connue pour être indemne de *R. solanacearum*.

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

Préparer 10 microtubes stériles de 1,5 ml avec 900 µl d'extrait concentré remis en suspension.

Verser 100 µl de la suspension de *R. solanacearum* dans le premier microtube. Homogénéiser au vortex.

Décimaliser les niveaux de contamination 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 pour obtenir neuf répliques de chaque échantillon témoin. Stocker entre -16 et -24 °C jusqu'à leur utilisation.

La présence et le niveau de *R. solanacearum* dans les échantillons témoins doivent être confirmés en premier lieu par IF.

Pour le test PCR, réaliser une extraction d'ADN sur des échantillons témoins positifs et négatifs pour chaque série d'échantillons des tests.

Pour les tests IF et FISH, réaliser des tests sur des échantillons témoins positifs et négatifs pour chaque série d'échantillons des tests.

Pour les tests IF et FISH, *R. solanacearum* doit être détecté au moins dans les 10⁶ et 10⁴ cellules/ml des témoins positifs et dans aucun des témoins négatifs.

Appendice 4

Tampons pour les procédures de test

GENERALITES: 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 50 mM, pH 7,0)

Ce tampon est utilisé pour l'extraction de la bactérie des tissus de la plante par homogénéisation ou agitation.

Na₂HPO₄ (anhydre) 4,26 g

KH₂PO₄ 2,72 g

Eau distillée 1,00 l

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

Les composants supplémentaires suivants peuvent être utiles:

	Usage	Quantité (par L)
Flocons de Lubrol	Défloculant*	0,5 g
DC silicone antimousse	Agent antimoussant*	1,0 ml
Pyrophosphate tétrasodique	Antioxydant	1,0 g
Polyvinylpyrrolidone-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 10 mM, pH 7,2)

Ce tampon est utilisé en vue de la remise en suspension et de la dilution des extraits de talons de tubercules de pomme de terre à la suite de la concentration en extrait concentré par centrifugation.

Na₂HPO₄.12H₂O 2,7 g

NaH₂PO₄.2H₂O 0,4 g

Eau distillée 1,0 l

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

2. Tampons pour le test d'immunofluorescence

2.1. Tampon IF:PBS 10 mM, pH 7,2

Ce tampon est utilisé pour la dilution des anticorps

Na₂HPO₄.12H₂O 2,7 g

NaH₂PO₄.2H₂O 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.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	3,2 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,15 g
Glycérol	50 ml
Eau distillée	100 ml

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

3. Tampons pour le test ELISA indirect

3.1. Tampon double concentration, pH 9,6.

Na_2CO_3	6,36 g
NaHCO_3	11,72 g
Eau distillée	1,00 l

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

Du sulfite de sodium (0,2 %) peut être ajouté comme antioxydant en cas de besoin pour empêcher la constitution de composés aromatiques oxydés.

3.2. PBS 10X, pH 7,4

NaCl	80,0 g
KH_2PO_4	2,0 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	29,0 g
KCl	2,0 g
Eau distillée	1,0 l

3.3. PBS-Tween

PBS 10X	100 ml
10 % de Tween 20	5 ml
Eau distillée	895 ml

3.4. Tampon de blocage (anticorps) (doit être fraîchement préparé)

PBS 10X	10,0 ml
Polyvinylpyrrolidone-44000 (PVP-44)	2,0 g
10 % de Tween 20	0,5 ml
Poudre de lait	0,5 g
Eau distillée	Porter à 100 ml

3.5. Solution substrat de phosphatase alcaline, pH 9,8

Diéthanamine	97 ml
Eau distillée	800 ml

Mélanger et ajuster le pH à 9,8 avec de l'acide chlorhydrique (HCl) concentré.

Porter à 1 litre avec de l'eau distillée.

Ajouter 0,2 g de MgCl_2

Dissoudre deux comprimés de substrat de phosphatase de 5 mg

(Sigma) par 15 ml de solution.

4. Tampons pour le test DASI ELISA

- 4.1. Tampon double concentration, pH 9,6.
- | | |
|---------------------------------|----------|
| Na ₂ CO ₃ | 1,59 g |
| NaHCO ₃ | 2,93 g |
| Eau distillée | 1 000 ml |
- Dissoudre les ingrédients et vérifier le pH.
- 4.2. PBS 10X, pH 7,2 – 7,4
- | | |
|--|----------|
| NaCl | 80,0 g |
| NaH ₂ PO ₄ .2 H ₂ O | 4,0 g |
| Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O | 27,0 g |
| Eau distillée | 1 000 ml |
- 4.3. PBS-Tween
- | | |
|------------------|--------|
| PBS 10X | 50 ml |
| 10 % de Tween 20 | 5 ml |
| Eau distillée | 950 ml |
- 4.4. Tampon de substrat, pH 9,8
- | | |
|---------------|--------|
| Diéthanamine | 100 ml |
| Eau distillée | 900 ml |
- Mélanger et ajuster le pH à 9,8 avec de l'acide chlorhydrique (HCl)

Appendice 5

Détermination du degré de contamination lors des tests IF et FISH

1. Compter le nombre moyen de cellules fluorescentes typiques par champ (c).
2. Compter le nombre de cellules fluorescentes typiques par fenêtre de lame de microscope (C).
 $C = c \times S/s$
 où S = superficie (S) de la fenêtre d'une lame multipuits
 et s = superficie du champ de l'objectif
 $s = \pi i^2 / 4G^2K^2$ où i = coefficient du champ (dépend du type d'oculaire et varie de 8 à 24)
 K = coefficient du tube (1 ou 1,25)
 G = grossissement (100 fois, 40 fois, etc.) de l'objectif.
3. Compter le nombre de cellules fluorescentes typiques par millilitre d'extrait concentré remis en suspension (N)
 $N = C \times 1000/y \times F$
 où y = volume d'extrait concentré remis en suspension sur chaque fenêtre
 et F = facteur de dilution de l'extrait concentré remis en suspension

Appendice 6

Protocoles PCR et réactifs validés

N.B.: Les tests préliminaires doivent permettre la détection reproductible de 10³ à 10⁴ cellules de *R. solanacearum* par ml d'extrait d'échantillon.

Les tests préliminaires doivent également ne montrer aucun faux résultat positif avec une gamme de souches bactériennes sélectionnées (voir appendice 3).

1. Protocole PCR de Seal et al. (1993)

- 1.1. Oligonucléotides amorces
- | | |
|---------------------|---------------------------------------|
| Amorce sens OLI-1 | 5'-GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC-3' |
| Amorce antisens Y-2 | 5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3' |
- Taille prévue de l'amplimère de la matrice d'ADN de *R. solanacearum* = 288 bp

1.2. Mélange réactif pour PCR

Réactif	Quantité par réaction	Concentration finale
Eau ultrapure stérile	17,65 µl	
Tampon 10X pour PCR ¹ (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
Mélange dNTP (20 mM)	0,25 µl	0,2 mM
Amorce OLI-1 (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Amorce Y-2 (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Polymérase Taq (5 U/µl) ¹	0,1 µl	0,5 U
Volume de l'échantillon	2,0 µl	
Volume total:	25 µl	

¹ La méthode a été validée avec la polymérase Taq de PerkinElmer (AmpliTaq) et Gibco BRL.

1.3. Conditions de la réaction PCR

Exécuter le programme suivant:

- 1 cycle de: i) 2 minutes à 96 °C: dénaturation de la matrice ADN
 35 cycles de: ii) 20 secondes à 94 °C: dénaturation de la matrice ADN
 iii) 20 secondes à 68 °C: hybridation avec les amorces
 iv) 30 secondes à 72 °C: extension de l'ADN complémentaire
 1 cycle de: v) 10 minutes à 72 °C (extension finale)
 vi) maintenir à 4 °C.

NB: Ce programme a été optimisé pour une utilisation avec un thermocycleur PerkinElmer 9600. Une modification de la durée des étapes des cycles ii), iii) et iv) peut être nécessaire pour une utilisation avec d'autres modèles.

1.4. Analyse de restriction enzymatique de l'amplimère.

Les produits PCR amplifiés d'ADN de *R. solanacearum* produisent un polymorphisme de taille des fragments de restriction distinct avec l'enzyme Ava II après incubation à 37 °C.

2. Protocole PCR de Pastrik & Maiss (2000)

2.1. Oligonucléotides amorces

Amorce sens Ps-1 5'- AGT CGA ACG GCA GCG GGG G -3'

Amorce antisens Ps-2 5'- GGG GAT TTC ACA TCG GTC TTG CA -3'

Taille prévue de l'amplimère de la matrice d'ADN de *R. solanacearum* = 553 bp.

2.2. Mélange réactif pour PCR

Réactif	Quantité par réaction	Concentration finale
Eau ultrapure stérile	16,025 µl	
Tampon 10X pour PCR ¹	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (fraction V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
Mélange dNTP (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Amorce Ps-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Amorce Ps-2 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Polymérase Taq (5 U/µl) ¹	0,1 µl	0,5 U
Volume de l'échantillon	5,0 µl	
Volume total:	25,0 µl	

¹ Les méthodes ont été validées avec la polymérase Taq PerkinElmer (AmpliTaq) et Gibco BRL.

* Optimisée initialement pour le thermocycleur MJ Research PTC 200 avec la polymérase Taq Gibco. L'AmpliTaq de PerkinElmer et le tampon peuvent également être utilisés aux mêmes niveaux de concentration.

2.3. Conditions de la réaction PCR

Exécuter le programme suivant:

- 1 cycle de: i) 5 minutes à 95 °C: dénaturation de la matrice ADN
35 cycles de: ii) 30 secondes à 95 °C: dénaturation de la matrice ADN
iii) 30 secondes à 68 °C: hybridation avec les amorces
iv) 45 secondes à 72 °C: extension de l'ADN complémentaire
1 cycle de: v) 5 minutes à 72 °C (extension finale)
vi) maintenir à 4 °C.

NB: Ce programme a été optimisé pour une utilisation avec le thermocycleur MJ Research PTC 200. Une modification de la durée des étapes des cycles ii), iii) et iv) peut être nécessaire pour une utilisation avec d'autres modèles.

2.4. Analyse de restriction enzymatique de l'amplimère.

Les produits PCR amplifiés d'ADN de *R. solanacearum* produisent un polymorphisme de taille des fragments de restriction distinct avec l'enzyme *Taq I* après incubation à 65 °C pendant 30 minutes. Les fragments de restriction tirés du fragment spécifique de *R. solanacearum* ont une longueur de 457 bp et 96 bp.

3. Protocole PCR multiplex avec contrôle interne de la PCR (Patrik et al., 2002)

3.1. Oligonucléotides amorces

Amorce sens Rs-1-F 5'- ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA -3'

Amorce antisens Rs-1-R 5'- CCC AGT CAC GGC AGA GAC T -3'

Amorce sens Ns-5-F 5'- AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G -3'

Amorce antisens Ns-6-R 5'- GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC 3'

Taille prévue de l'amplimère de la matrice d'ADN de *R. solanacearum* = 718 bp (en présence de l'amorce Rs)

Taille de l'amplimère prévue du contrôle interne de la PCR de 18S ARNr = 310 bp (en présence de l'amorce Ns).

3.2. Mélange réactif pour PCR

Réactif	Quantité par réaction	Concentration finale
Eau ultrapure stérile	12,625 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 dNTP (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Amorce Rs-1-F (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Amorce Rs-1-R (10 µM)	2,05 µl	0,8 µM
Amorce Ns-5-F (10 µM) ²	0,15 µl	0,06 µM
Amorce Ns-6-R (10 µM) ²	0,15 µl	0,06 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 avec la polymérase Taq PerkinElmer (AmpliTaq) et Gibco BRL.

(2) Les concentrations des amorces Ns-5-F et Ns-6-R ont été optimisées pour l'extraction des noyaux de talons de pommes de terre utilisant la méthode de l'homogénéisation et de la purification de l'ADN de Patrik (2000) (voir section VI.A.6.1.a.). 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.

3.3. Conditions de la réaction PCR

Exécuter le programme suivant:

- 1 cycle de: i) 5 minutes à 95 °C: dénaturation de la matrice ADN
35 cycles de: ii) 30 secondes à 95 °C: dénaturation de la matrice ADN
iii) 30 secondes à 58 °C: hybridation avec les amorces
iv) 45 secondes à 72 °C: extension de l'ADN complémentaire
1 cycle de: v) 5 minutes à 72 °C (extension finale)
vi) maintenir à 4 °C

Note: Ce programme a été optimisé pour une utilisation avec le thermocycleur MJ Research PTC 200. Une modification de la durée des étapes des cycles ii), iii) et iv) peut être nécessaire pour une utilisation avec d'autres modèles.

3.4. Analyse de restriction enzymatique de l'amplimère.

Les produits PCR amplifiés d'ADN de *R. solanacearum* produisent un polymorphisme de taille des fragments de restriction distinct avec l'enzyme *Bsm* I ou un isoschizomère (p. ex.: *Mva* 1269 I) après incubation à 65 °C pendant 30 minutes.

4. Protocole PCR spécifique au biovar de *R. solanacearum* (Pastrik et al, 2001)

4.1. Oligonucléotides amorces

Amorce sens Rs-1-F 5'- ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA -3'

Amorce antisens Rs-1-R 5'- CCC AGT CAC GGC AGA GAC T -3'

Amorce antisens Rs-3-R 5'- TTC ACG GCA AGA TCG CTC -3'

Taille prévue de l'amplimère de la matrice d'ADN de *R. solanacearum*:

avec Rs-1-F/Rs-1-R = 718 bp

avec Rs-1-F/Rs-3-R = 716 bp

4.2. Mélange réactif pour PCR

a) PCR spécifique au biovar 1/2

Réactif	Quantité par réaction	Concentration finale
Eau ultrapure stérile	12,925 µl	
Tampon 10X pour PCR ¹	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (fraction V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
Mélange dNTP (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Amorce Rs-1-F (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Amorce Rs-1-R (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Polymérase Taq (5 U/µl) ¹	0,2 µl	1 U
Volume de l'échantillon	5,0 µl	
Volume total:	25,0 µl	

¹ Les méthodes ont été validées avec la polymérase Taq PerkinElmer (AmpliTaq) et Gibco BRL.

b) PCR spécifique au biovar 3/4/5

Réactif	Quantité par réaction	Concentration finale
Eau ultrapure stérile	14,925 µl	
Tampon 10X pour PCR ¹	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (fraction V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
Mélange dNTP (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Amorce Rs-1-F (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Amorce Rs-3-R (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Polymérase Taq (5 U/µl) ¹	0,2 µl	1 U
Volume de l'échantillon	5,0 µl	
Volume total:	25,0 µl	

¹ Les méthodes ont été validées avec la polymérase Taq PerkinElmer (AmpliTaq) et Gibco BRL.

4.3. Conditions de la réaction PCR

Exécuter le programme suivant pour les réactions spécifiques au biovar 1/2 et au biovar 3/4/5:

- 1 cycle de:
- i) 5 minutes à 95 °C: dénaturation de la matrice ADN
- 35 cycles de:
- ii) 30 secondes à 95 °C: dénaturation de la matrice ADN
 - iii) 30 secondes à 58 °C: hybridation avec les amorces
 - iv) 45 secondes à 72 °C: extension de l'ADN complémentaire
- 1 cycle de:
- v) 5 minutes à 72 °C (extension finale)
 - vi) maintenir à 4 °C

N.B.: Ce programme a été optimisé pour une utilisation avec le thermocycleur MJ Research PTC 200. Une modification de la durée des étapes des cycles ii), iii) et iv) peut être nécessaire pour une utilisation avec d'autres modèles.

4.4. Analyse de restriction enzymatique de l'amplimère.

Les produits PCR amplifiés d'ADN de *R. solanacearum* utilisant les amorces Rs-1-F et Rs-1-R produisent un polymorphisme de taille des fragments de restriction distinct avec l'enzyme *Bsm I* ou un isoschizomère (p. ex.: *Mva I* 1269 I) après incubation à 65 °C pendant 30 minutes. Les produits PCR amplifiés d'ADN de *R. solanacearum* utilisant les amorces Rs-1-F et Rs-3-R n'ont pas de sites de restriction.

5. Préparation du tampon de lest

5.1. Bleu de bromophénol (solution concentrée à 10 %)

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

5.2. Tampon de lest

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

6. Tampon tris-acétate EDTA (TAE) 10X, pH 8,0

Tampon tris	48,40 g
Acide acétique glacial	11,42 ml
EDTA (sel disodique)	3,72 g
Eau distillée	1,00 L

Diluer jusqu'à 1X avant utilisation.

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

Appendice 7

Réactifs validés pour le test FISH

1. Oligosondes

Sonde OLI-1-CY3 spécifique de *R. solanacearum*: 5'- ggc agg tag caa gct acc ccc-3'

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

2. 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 pour la biologie 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 0,1M (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 du NaOH. ATTENTION! NE PAS UTILISER UN PH-METRE DANS LES SOLUTIONS CONTENANT DU PARAFORMALDEHYDE]
- iii) Filtrer la solution au travers d'un filtre à membrane de 0,22 µm et protéger de la poussière à 4 °C jusqu'à l'utilisation.

3. 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 1X comme requis.

4. Solution d'hybridation

Hybmix 1X	
Dodécylsulfate de sodium (DSS)	0,01 %
Formamide	30 %
Sonde EUB 338	5 ng/µl
Sonde OLI-1 ou OLI-2	5 ng/µl

Préparer des quantités de solution d'hybridation suivant les calculs du tableau 1. Pour chaque lame (contenant deux échantillons différents en double), 90 µl de solution d'hybridation sont requis. IMPORTANT: LE FORMAMIDE EST TRES TOXIQUE. IL CONVIENT DONC DE PORTER DES GANTS ET DE PRENDRE LES MESURES DE SECURITE NECESSAIRES!

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

Nombre de lames:	1	4	6	8	10
Eau ultrapure stérile	23, 1	92,4	138,6	184,8	231,0
Hybmix 3X	30,0	120,0	180,0	240,0	300,0
1 % de dodécylsulfate de sodium (DSS)	0,9	3,6	5,4	7,2	9,0
Formamide	27,0	108,0	162,0	216,0	270,0
Sonde EUB 338 (100 ng/µl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Sonde OLI -1 ou OLI-2 (100 ng/µl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Volume total (µl)	90,0	360,0	540,0	720,0	900,0

N.B.: Stocker dans l'obscurité, 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 0,1M, 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 à 121 °C pendant 15 minutes.

Appendice 8

Culture d'aubergines et de tomates

Semer des graines de tomates (*Lycopersicon esculentum*) ou 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 ou les tomates doivent être cultivées en serre dans les conditions d'environnement suivantes avant l'inoculation:

Durée du jour:	14 heures ou durée naturelle de la journée si elle est supérieure,
Température:	jour: 21 à 24 °C, nuit: 14 à 18 °C.

Variété sensible de tomate: «Moneymaker»

Variété sensible d'aubergine: «Black Beauty»

Fournisseurs: Voir site web <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

REFERENCES

1. Amann, R.I., L. Krumholz and D.A. Stahl. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. J. Bacteriol. 172: 762-770.
2. Anon. 1998. Council Directive 98/57/EC of 20 July 1998 on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Official Journal of the European Communities L235, 1-39.
3. Boudazin, G., A.C. Le Roux, K. Josi, P. Labarre and B. Jouan. 1999. Design of division specific primers of *Ralstonia solanacearum* and application to the identification of European isolates. European Journal of Plant Pathology 105; 373-380.
4. Caruso, P., Gorris, M.T., Cambra, M., Palomo, J. L., Collar, J and Lopez, M.M. 2002. Enrichment Double-Antibody Sandwich Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay That Uses a Specific Monoclonal Antibody for sensitive Detection of *Ralstonia solanacearum* in Asymptomatic Potato Tubers. Applied and Environmental Microbiology, 68, 3634-3638.
5. Cook, D., Barlow, E. and Sequeira, L. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. Molecular Plant-Microbe Interactions 1:113-121.
6. Elphinstone, J. G., Hennessy, J., Wilson, J. K. and Stead, D. E. 1996. Sensitivity of detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. EPPO Bulletin 26; 663-678.
7. Englebrecht, M. C. (1994) Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. In: A. C. Hayward (ed.) Bacterial Wilt Newsletter 10, 3-5. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.

8. Hayward, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Applied Bacteriology 27; 265-277.
9. Hayward, A.C., El-Nashaar, H.M., Nydegger, U. and De Lindo, L. 1990. Variation in nitrate metabolism in biovars of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Applied Bacteriology 69; 269-280.
10. Ito, S., Y. Ushijima, T. Fujii, S. Tanaka, M. Kameya-Iwaki, S. Yoshiwara and F. Kishi. 1998. Detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in soil using a semi-selective medium and a PCR technique. J. Phytopathology 146; 379-384.
11. Janse, J. D. (1988) A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 18, 343-351.
12. 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.
13. Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology 44; 693-695.
14. Klement Z.; Rudolph, K and D. C. Sands, 1990. Methods in Phytobacteriology. Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 pp.
15. Lelliott, R.A. and Stead, D.E. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Blackwell scientific Publications Ltd., Oxford. 216 pp.
16. Lopez, M.M., Gorris, M.T., Llop, P., Cubero, J., Vicedo, B., Cambra, M., 1997. Selective enrichment improves selective isolation, serological and molecular detection of plant pathogenic bacteria. In: H.W. Dehne et al., (eds). Kluwer Academic Publishers. pp. 117-121.
17. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J., 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. Applied and Environmental Microbiology, 60, 2286-2295.
18. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Phytopathology 85; 528-536.
19. Opina, N., F. Tavner, G. Holloway, J.-F. Wang, T.-H. Li, R. Maghirang, M. Fegan, A. C. Hayward, V. Krishnapillai, W.F. Hong, B.W. Holloway, J.N. Timmis. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). As Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol. 5; 19-33.
20. Pstrik, K.H. and Maiss, E. 2000. Detection of *R. solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. J. Phytopathology 148; 619-626.
21. Pstrik, K. H., Elphinstone, J.G. and Pukall, R. 2002. Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification of 16S-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control. European Journal of Plant Pathology 108, 831-842.
22. Robinson-Smith, A., Jones, P., Elphinstone, J. G. and Forde, S.M.D. (1995) Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. Food and Agricultural Immunology 7, 67-79.
23. Schaad, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Schaad [Hrsg.]. - 3. ed.; St. Paul, Minnesota: 373 pp.
24. Seal, S.E., L.A. Jackson, J.P.W. Young, and M.J. Daniels. 1993. Detection of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. J. Gen. Microbiol. 139: 1587-1594.
25. Smith, J.J., Offord, L.C., Holderness, M. and Saddler, G.S. 1995. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. Applied and Environmental Microbiology 61; 4262-4268.
26. 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.
27. Taghavi, M., Hayward, A.C., Sly, L.I., Fegan, M. 1996. Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. International Journal of Systematic Bacteriology 46; 10-15.
28. Van Der Wolf, J. M., Bonants, P.J.M., Smith, J.J., Hagenaar, M., Nijhuis, E., Van Beckhoven, J.R.C., Saddler, G.S., Trigalet, A., Feuillade, R. 1998. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* Race 3 in Western Europe as determined by AFLP, RC-PFGE and rep-PCR. In: Prior, P., Allen, C. and Elphinstone, J. (eds.) Bacterial wilt disease: Molecular and Ecological Aspects. Springer (Berlin) pp. 44-49.
29. Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N., Stead, D.E. and Boonham, N. 1999. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains using an automated and quantitative fluorescent 5' nuclease TaqMan assay. Applied and Environmental Microbiology 66; 2853-2858.
30. Wullings, B.A., A.R. van Beuningen, J.D. Janse and A.D.L. Akkermans. 1998. Detection of *R. solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent in situ hybridization with 23S rRNA-targeted probes. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4546-4554.

ANNEXE III

1. Dans tous les cas d'apparition suspectée pour lesquels on a constaté, lors du ou des tests de dépistage pratiqués selon les méthodes décrites à l'annexe II pour le matériel végétal énuméré et dans tous les autres cas, une réaction positive à confirmer ou infirmer par ces méthodes, il convient de garder et de conserver dans des conditions appropriées jusqu'à l'achèvement desdites méthodes:
 - tous les tubercules faisant partie de l'échantillon et, dans la mesure du possible, toutes les plantes 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.

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 pendant au moins un mois après la procédure de notification prévue à l'article 5, paragraphe 2:
 - le matériel visé au point 1 et
 - un échantillon de la tomate ou aubergine contaminée par l'inoculation d'extrait de tubercule ou de plante, le cas échéant, et
 - la culture isolée de l'organisme.

ANNEXE IV

Les éléments sur lesquels porte l'enquête visée à l'article 5, paragraphe 1, point a) i), sont les suivants, lorsqu'ils sont pertinents:

- i) lieux de production:
 - culture, actuelle ou passée, de pommes de terre qui sont liées par clonage à des pommes de terre déclarées contaminées par l'organisme,
 - culture, actuelle ou passée, de tomates provenant de la même source que les tomates déclarées contaminées par l'organisme,
 - culture, actuelle ou passée, de pommes de terre ou de tomates placées sous contrôle officiel en raison de la présence suspectée de l'organisme,
 - culture, actuelle ou passée, de pommes de terre qui sont liées par clonage à des pommes de terre qui ont été cultivées dans des lieux de production déclarés contaminés par l'organisme,
 - culture de pommes de terre ou de tomates situées à proximité de lieux de production contaminés, et notamment de ceux partageant du matériel et des installations de production soit directement soit par l'intermédiaire d'un entrepreneur commun,
 - utilisation, pour l'irrigation ou le traitement par pulvérisation, d'eaux de surface provenant d'une source dont la contamination par l'organisme est confirmée ou suspectée,
 - utilisation, pour l'irrigation ou le traitement par pulvérisation, d'eaux de surface provenant d'une source utilisée en commun avec des lieux de production dont la contamination par l'organisme est confirmée ou suspectée,
 - submersion actuelle ou passée par des eaux de surface dont la contamination par l'organisme est confirmée ou suspectée et
- ii) eaux de surface utilisées pour l'irrigation ou le traitement par pulvérisation d'un ou plusieurs champs ou lieux de production dont la contamination par l'organisme est confirmée ou qui ont submergé ceux ci.

ANNEXE V

1. La détermination de l'étendue de la contamination probable visée à l'article 5, paragraphe 1, point a) iii) et point c) iii), comprend les éléments suivants:
 - le matériel végétal énuméré cultivé en un lieu de production déclaré contaminé conformément à l'article 5, paragraphe 1, point a) ii),
 - le ou les lieux de production ayant un lien avec le matériel végétal énuméré qui a été déclaré contaminé conformément à l'article 5, paragraphe 1, point a) ii), y compris ceux partageant l'équipement et les installations de production soit directement soit par l'intermédiaire d'un entrepreneur commun,
 - le matériel végétal énuméré produit dans le ou les lieux de production visés au tiret précédent, ou présent dans lesdits lieux pendant la période où le matériel végétal énuméré qui a été déclaré contaminé conformément à l'article 5, paragraphe 1, point a) ii), était présent dans le lieu de production visé au premier tiret,

- les locaux où le matériel végétal énuméré provenant des lieux de production visés aux tirets ci-dessus est manipulé,
 - tout matériel, véhicule, bâtiment, entrepôt ou partie de ceux-ci, ainsi que tout autre objet, y compris l'emballage, qui peut avoir été en contact avec le matériel végétal énuméré qui a été déclaré contaminé conformément à l'article 5, paragraphe 1, point a) ii),
 - tout matériel végétal énuméré entreposé dans des équipements ou objets visés au tiret précédent ou en contact avec eux, avant leur nettoyage ou leur désinfection,
 - à la suite de l'enquête et des essais visés à l'article 5, paragraphe 1, point a) i), dans le cas de la pomme de terre, les tubercules ou les plants ayant un lien clonal ou parental et, dans le cas de la tomate, une source commune avec le matériel végétal énuméré qui a été déclaré contaminé conformément à l'article 5, paragraphe 1, point a) ii), et pour lequel, 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 d'identification variétale peut être opéré sur les tubercules ou plants contaminés,
 - le ou les lieux de production du matériel végétal énuméré visé au tiret précédent,
 - le ou les lieux de production du matériel végétal énuméré utilisant, pour l'irrigation ou le traitement par pulvérisation, de l'eau déclarée contaminée conformément à l'article 5, paragraphe 1, point c) ii),
 - le matériel végétal énuméré produit dans des champs submergés par des eaux de surface dont la contamination est confirmée.
2. La détermination de la propagation possible visée à l'article 5, paragraphe 1, point a) iv) et point c) iii), comprend:
- i) dans les cas visés à l'article 5, paragraphe 1, point a) iv),
 - la proximité d'autres lieux de production où le matériel végétal énuméré est cultivé,
 - la production et l'utilisation communes de stocks de plants pommes de terre,
 - les lieux de production utilisant des eaux de surface, pour l'irrigation ou le traitement par pulvérisation du matériel végétal énuméré, dans les cas où il existe ou existait un risque d'écoulement d'eaux de surface à partir des lieux de production déclarés contaminés conformément à l'article 5, paragraphe 1, point a) ii), ou un risque de submersion de ceux ci;
 - ii) dans les cas où des eaux de surface ont été déclarées contaminées conformément à l'article 5, paragraphe 1, point c) ii):
 - le ou les lieux de production produisant du matériel végétal énuméré adjacents aux eaux de surface déclarées contaminées ou risquant d'être submergés par ces eaux,
 - tout bassin d'irrigation délimité, associé aux eaux de surface déclarées contaminées,
 - les étendues d'eau en liaison avec des eaux de surface déclarées contaminées, en tenant compte:
 - de la direction et du niveau de débit de l'eau déclarée contaminée
 - de la présence de plantes hôtes sauvages de la famille des solanacées.
3. La notification visée à l'article 5, paragraphe 2, premier alinéa, comprend:
- immédiatement après la confirmation de la présence de l'organisme par des tests de laboratoire, suivant les méthodes prévues à l'annexe II, au minimum:
 - pour les pommes de terre,
 - a) la dénomination variétale du lot,
 - b) le type (conservation, plants, etc.) et, le cas échéant, la catégorie de plants,
 - pour les plants de tomates, la dénomination variétale du lot et, le cas échéant, la catégorie,
 - sans préjudice des conditions de notification d'une apparition suspectée prévues à l'article 4, paragraphe 3, l'Etat membre dans lequel l'apparition a été confirmée, lorsqu'il y a un risque de contamination du matériel végétal énuméré en provenance ou à destination d'un autre ou d'autres Etats membres, notifie immédiatement à l'Etat membre ou aux Etats membres concerné(s) les informations nécessaires pour se conformer à l'article 5, paragraphe 3, telles que:
 - a) la dénomination variétale du lot de pommes de terre ou de tomates;
 - b) les nom et adresse de l'expéditeur et du destinataire;
 - c) la date de livraison du lot de pommes de terre ou de tomates;
 - d) la taille du lot de pommes de terre ou de tomates livré;
 - e) une copie du passeport phytosanitaire ou, le cas échéant, au moins le numéro du passeport phytosanitaire ou, le cas échéant, le numéro d'enregistrement du producteur ou du revendeur et une copie du bon de livraison.

La Commission est immédiatement informée de la communication de ces informations.

4. Le détail de la notification supplémentaire visée à l'article 5, paragraphe 2, deuxième alinéa, comprend: après l'achèvement de toutes les investigations, pour chaque cas:
 - a) la date à laquelle la contamination a été confirmée;
 - b) une brève description des investigations menées afin d'identifier la source et la propagation possible de la contamination, y compris le niveau de l'échantillonnage effectué;
 - c) des informations sur la ou les sources identifiées ou présumées de contamination;
 - d) des précisions sur l'étendue de la contamination déclarée, y compris le nombre de lieux de production et, pour les pommes de terre, le nombre de lots avec indication de la variété et, s'il s'agit de plants de pommes de terre, la catégorie;
 - e) 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;
 - f) des précisions sur les eaux déclarées, y compris le nom et la localisation de la masse d'eau et l'étendue de la déclaration/interdiction d'irrigation;
 - g) pour tout envoi ou lot de plants de tomates déclaré contaminé, les certificats prescrits à l'article 13, paragraphe 1, point ii), de la directive 29/2000/CE et le numéro de passeport, conformément à la liste de l'annexe V, partie A, chapitre I, point 2.2 de la directive 29/2000/CE;
 - h) toutes les autres informations que la Commission pourrait souhaiter en ce qui concerne le foyer confirmé.

ANNEXE VI

1. Les dispositions visées à l'article 6, paragraphe 1, sont les suivantes:
 - utilisation comme aliment des animaux après un traitement thermique de telle sorte qu'il n'y ait aucun risque de survie de l'organisme ou
 - élimination dans un site d'élimination des déchets officiellement agréé ne présentant aucun risque identifiable de propagation de l'organisme dans l'environnement, par exemple par infiltration dans les terres agricoles ou contact avec des points d'eau susceptibles d'être utilisés pour l'irrigation de terres agricoles ou
 - incinération ou
 - 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 présentent 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 pas de risque identifiable de propagation de l'organisme; ces mesures et leur justification doivent être notifiées à la Commission et aux autres Etats membres.

Tout déchet restant, lié aux processus susmentionnés, et découlant de ceux-ci doit être éliminé selon des méthodes officiellement agréées conformément à l'annexe VII de la présente directive.

2. L'utilisation ou l'élimination appropriées du matériel végétal énuméré visé à l'article 6, paragraphe 2, sous le contrôle des organismes officiels compétents de l'Etat membre ou 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 par l'organisme officiel compétent de l'Etat membre où les pommes de terre doivent être conditionnées ou transformées des installations d'élimination des déchets visées aux premier et deuxième tirets, comportent:
 - i) pour les tubercules de pomme de terre:
 - 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 et à une 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 pas de risque identifiable de propagation de l'organisme et sous réserve de l'agrément desdits organismes officiels compétents;
 - ii) pour d'autres parties de plantes comprenant la tige et les débris de feuillage:
 - destruction ou
 - une autre utilisation ou élimination, pour autant qu'il soit établi qu'il n'y a pas de risque identifiable de propagation de l'organisme et sous réserve de l'agrément desdits organismes officiels compétents.

3. Les méthodes appropriées de décontamination des objets visés à l'article 6, paragraphe 3, sont le nettoyage et, le cas échéant, la désinfection, de telle sorte qu'il n'y ait aucun risque identifiable de propagation de l'organisme; elles sont appliquées sous le contrôle du service.
4. Les diverses mesures à mettre en œuvre par le service dans la zone délimitée établie conformément à l'article 5, paragraphe 1, point a) iv), et point c) iii), auxquelles il est fait référence à l'article 6, paragraphe 4, sont les suivantes:
 - 4.1. Dans les cas où des lieux de production ont été déclarés contaminés conformément à l'article 5, paragraphe 1, point a) ii):
 - a) dans un champ ou une unité de production en culture protégée déclaré(e) contaminé(e) conformément à l'article 5, paragraphe 1, point a) ii), soit:
 - i) pendant au moins les quatre campagnes suivant la contamination déclarée:
 - des mesures sont prises en vue d'éliminer les repousses de pommes de terre et de tomates et les autres plantes hôtes de l'organisme, y compris les plantes adventices de la famille des solanacées et
 - ne peuvent être plantés:
 - ni tubercules ni plants ni graines de pommes de terre,
 - ni plants ni semences de tomates,
 - en prenant en considération les caractéristiques biologiques de l'organisme:
 - ni d'autres plantes hôtes,
 - ni des plantes de l'espèce *Brassica* pour lesquelles il existe un risque identifié de survie de l'organisme,
 - ni culture pour laquelle il existe un risque identifié de propagation de l'organisme,
 - durant la première campagne de récolte des pommes de terre ou des tomates 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 de tomates et d'autres plantes hôtes, y compris des plantes adventices de la famille des solanacées, lors des inspections officielles, pendant deux campagnes consécutives au moins avant la plantation:
 - dans le cas des pommes de terre, seule la production de pommes de terre de conservation sera autorisée,
 - dans le cas des pommes de terre et des tomates, les tubercules de pomme de terre ou les plants de tomates récoltés, selon le cas, seront testés suivant la procédure détaillée à l'annexe II,
 - durant la campagne de récolte des pommes de terre ou des tomates suivant celle visée au tiret précédent et après un cycle approprié de rotation, qui est de deux ans au moins si des plants de pommes de terre doivent être cultivés, des recherches officielles sont effectuées conformément à l'article 2, paragraphe 1, ou
 - ii) pendant les cinq campagnes suivant celle de la contamination déclarée:
 - des mesures sont prises en vue d'éliminer les repousses de pommes de terre et de tomates et les autres plantes hôtes de l'organisme spontanément présentes, y compris les plantes adventices de la famille des solanacées, et
 - le champ est mis et maintenu, durant les trois premières années, soit en jachère nue, soit en céréales, selon le risque identifié, soit en pâturage permanent, auquel cas il est fréquemment fauché à ras ou mis en pâturage intensif, soit enherbé pour la production de semences, puis pendant les deux années suivantes, planté de plantes non hôtes de l'organisme pour lesquelles il n'y a pas de risque identifié de survie ou de propagation de l'organisme,
 - durant la première campagne de récolte des pommes de terre ou des tomates 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 de tomates et d'autres plantes hôtes, y compris des plantes adventices de la famille des solanacées, pendant au moins les deux campagnes consécutives précédant la plantation:
 - dans le cas des pommes de terre, la production de plants ou de pommes de terre de conservation sera autorisée,
 - les tubercules de pomme de terre ou les plants de tomates récoltés, selon le cas, seront testés suivant la procédure détaillée à l'annexe II;
 - b) dans tous les autres champs du lieu de production contaminé et à condition que les organismes officiels compétents acquièrent la certitude que le risque constitué par les repousses de pommes de terre et de tomates et les autres plantes hôtes de l'organisme, y compris les adventices de la famille des solanacées spontanément présentes, a été éliminé:
 - au cours de la campagne suivant la contamination déclarée,
 - aucun tubercule, plante ou graine ou autre plante hôte de l'organisme n'est planté ni semé ou

- dans le cas des tubercules de pomme de terre, des plants de pommes de terre certifiés peuvent être plantés exclusivement en vue de la production de pommes de terre de conservation,
 - dans le cas des plants de tomates, des plants de tomates issus de semences répondant aux critères de la directive 29/2000/CE pour la production de fruits uniquement,
 - au cours de la deuxième campagne suivant la contamination déclarée:
 - dans le cas des pommes de terre, seuls des plants de pommes de terre certifiés ou des plants de pommes de terre testés officiellement en vue de détecter la présence de 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 plants ou de pommes de terre de conservation,
 - dans le cas des tomates, seuls des plants de tomates issus de semences répondant aux critères de la directive 29/2000/CE ou, dans le cas de multiplication végétative de plants de tomates issus de ces semences et cultivés dans des lieux de production sous contrôle officiel autres que ceux visés au point 4.1, sont plantés soit pour la production de plants ou pour la production de fruits,
 - pendant au moins la troisième campagne suivant celle de la contamination déclarée,
 - dans le cas des pommes de terre, 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 plants de pommes de terre ou de pommes de terre de conservation,
 - dans le cas des tomates, seuls des plants de tomates issus de semences répondant aux critères de la directive 29/2000/CE ou de plants de tomates cultivés sous contrôle officiel issus de ces plants sont plantés pour la production de plants ou de fruits,
 - pendant chacune des campagnes visées aux tirets précédents, des mesures seront prises pour éliminer les repousses de pommes de terre et d'autres plantes hôtes de l'organisme spontanément présentes et une inspection officielle de la culture est menée à des moments appropriés et, dans chaque champ de pommes de terre, les pommes de terre récoltées sont testées officiellement suivant la procédure détaillée à l'annexe II;
- c) immédiatement après la déclaration de contamination conformément à l'article 5, paragraphe 1, point a) ii), et après la première campagne suivante:
- toutes les machines et installations de stockage sur le lieu de production servant à la production des pommes de terre ou des tomates sont nettoyées et, si nécessaire, désinfectées selon des méthodes appropriées précisées au point 3,
 - des contrôles officiels des programmes d'irrigation ou de traitement par pulvérisation, y compris l'interdiction de ces programmes, sont mis en place en cas de besoin pour prévenir la propagation de l'organisme;
- d) dans une unité de production en culture protégée déclarée contaminée conformément à l'article 5, paragraphe 1, point a) ii), permettant le remplacement total du milieu de culture:
- aucun tubercule, plant ou graine de pomme de terre ni aucune autre plante hôte de l'organisme, y compris les plants et semences de tomates, n'est planté(e), sauf si ladite unité de production a été soumise à des mesures sous contrôle officiel visant l'élimination de l'organisme et de tout matériel végétal hôte, y compris, au moins, le remplacement complet du milieu de culture ainsi que le nettoyage et, le cas échéant, la désinfection de ladite unité et de tout l'équipement, et si, par la suite, elle a été agréée pour la production de pommes de terre ou de tomates par les organismes officiels compétents et
 - la production de pommes de terre est issue de plants de pommes de terre certifiés ou de minitubercules ou de microplantes provenant de sources testées,
 - la production de tomates est issue de semences répondant aux critères de la directive 29/2000/CE ou dans le cas de multiplication végétative de plants de tomates issus de ces semences cultivés sous contrôle officiel,
 - des contrôles officiels des programmes d'irrigation ou de traitement par pulvérisation, y compris l'interdiction de ces programmes, sont mis en place en cas de besoin pour prévenir la propagation de l'organisme.
- 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, fait en sorte que toutes les machines et installations de stockage sur le lieu de production et ayant servi à la production de pommes de terre ou de tomates sont nettoyées et, si nécessaire, désinfectées selon des méthodes appropriées précisées au point 3;

- b) immédiatement après la contamination déclarée et pendant au moins trois campagnes:
- ba) dans les cas où la zone délimitée a été déterminée conformément à l'article 5, paragraphe 1, point a) iv):
- fait surveiller par leurs organismes officiels compétents les installations pratiquant la culture, le stockage ou la manutention de tubercules de pomme de terre ou de tomates, ainsi que les locaux des entreprises exploitant sous contrat du matériel utilisé pour la production de pommes de terre ou de tomates,
 - exige que seuls des plants certifiés ou des plants cultivés sous contrôle officiel soient plantés pour toutes les cultures de pommes de terre dans ladite zone, et que soient soumis à des tests les plants de pommes de terre récoltés sur des lieux de production dont il a été établi qu'ils sont probablement contaminés en vertu de l'article 5, paragraphe 1, point a) iii),
 - exige, dans toutes les entreprises de la zone, la manutention séparée des plants de pommes de terre et des pommes de terre de conservation, ou la mise en œuvre d'un système de nettoyage et, le cas échéant, de désinfection entre la manutention des plants et les stocks de conservation,
 - exige la plantation de plants de tomates issus uniquement de semences répondant aux critères de la directive 29/2000/CE ou, dans le cas de multiplication végétative, de plants de tomates issus de ces semences cultivés sous contrôle officiel, pour toutes les cultures de tomates dans cette zone,
 - procède à des recherches officielles conformément à l'article 2, paragraphe 1;
- bb) dans les cas où des eaux de surface ont été déclarées contaminées conformément à l'article 5, paragraphe 1, point c) ii), ou incluses parmi les éléments de propagation possible de l'organisme conformément à l'annexe V, point 2:
- procède à une enquête annuelle à des moments opportuns, y compris au prélèvement d'échantillons d'eaux de surface et, le cas échéant, de plantes hôtes appropriées de la famille des solanacées dans les points d'eau concernés ainsi qu'à des tests effectués suivant les méthodes figurant à l'annexe II pour le matériel végétal énuméré et pour les autres cas,
 - met en place des contrôles officiels des programmes d'irrigation et de traitement par pulvérisation, y compris l'interdiction de l'utilisation de l'eau déclarée contaminée pour l'irrigation et le traitement par pulvérisation du matériel végétal énuméré et, le cas échéant, d'autres plantes hôtes, pour prévenir la propagation de l'organisme. Cette interdiction peut être réexaminée sur la base des résultats obtenus au cours de ladite enquête annuelle, et les déclarations de contamination peuvent être retirées lorsque les organes officiels compétents sont certains que les eaux de surface ne sont plus contaminées. L'utilisation de l'eau soumise à interdiction peut être autorisée sous contrôle officiel pour l'irrigation ou le traitement par pulvérisation lorsque les techniques officiellement agréées qui sont employées éliminent l'organisme et empêchent sa propagation,
 - dans les cas où des effluents de déchets liquides sont contaminés, met en place des contrôles officiels de l'élimination des déchets solides ou liquides des entreprises de transformation industrielle ou de conditionnement traitant du matériel végétal énuméré;
- c) établissent, le cas échéant, un programme de remplacement de tous les stocks de plants de pommes de terre sur une période appropriée.

ANNEXE VII

Les méthodes d'élimination des déchets officiellement agréées visées à l'annexe VI, paragraphe 1, doivent être conformes aux dispositions suivantes de façon à prévenir tout risque identifiable de propagation de l'organisme:

- i) les déchets de pommes de terres et de tomates (y compris les épluchures de pommes de terre et les pommes de terre et tomates éliminées) ainsi que tout autre déchet solide associé aux pommes de terres et aux tomates (y compris de la terre, des pierres et autres débris) sont éliminés:
- dans un centre d'élimination des déchets officiellement agréé ne présentant aucun risque identifiable de propagation de l'organisme dans l'environnement via, par exemple, des infiltrations dans des terres agricoles ou un contact avec des points d'eau susceptibles d'être utilisés pour l'irrigation des terres agricoles. Les déchets sont acheminés directement vers le site dans des conditions d'isolement prévenant tout risque de perte de déchets, ou
 - par incinération, ou
 - par 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) Les effluents liquides: 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 ou des points d'eau susceptibles d'être utilisés pour l'irrigation 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.
