

Diario Oficial

de la Unión Europea

L 206

Edición
en lengua española

Legislación

49º año

27 de julio de 2006

Sumario

I Actos cuya publicación es una condición para su aplicabilidad

- ★ Directiva 2006/60/CE de la Comisión, de 7 de julio de 2006, que modifica los anexos de la Directiva 90/642/CEE del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos de trifloxistrobin, tiabendazol, abamectina, benomilo, carbendazima, tiofanato-metil, miclobutanil, glifosato, trimetilsulfonio, fenpropimorf y cloromequat ⁽¹⁾ 1
- ★ Directiva 2006/61/CE de la Comisión, de 7 de julio de 2006, que modifica los anexos de las Directivas 86/362/CEE, 86/363/CEE y 90/642/CEE del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos de atrazina, azinfos-etil, ciflutrin, etefon, fention, metamidofos, metomilo, paraquat y triazofos ⁽¹⁾ 12
- ★ Directiva 2006/62/CE de la Comisión, de 12 de julio de 2006, por la que se modifican los anexos de las Directivas 76/895/CEE, 86/362/CEE, 86/363/CEE y 90/642/CEE del Consejo en lo relativo a los contenidos máximos de desmedifam, fenmedifam y clorfenvinfós ⁽¹⁾ 27
- ★ Directiva 2006/63/CE de la Comisión, de 14 de julio de 2006, por la que se modifican los anexos II a VII de la Directiva 98/57/CE del Consejo sobre el control de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* 36
- ★ Directiva 2006/64/CE de la Comisión, de 18 de julio de 2006, por la que se modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo a fin de incluir las sustancias activas clopiralida, ciprodinil, fosetil y trinexapac ⁽¹⁾ 107

⁽¹⁾ Texto pertinente a efectos del EEE.

Precio: 22 EUR

ES

Los actos cuyos títulos van impresos en caracteres finos son actos de gestión corriente, adoptados en el marco de la política agraria, y que tienen generalmente un período de validez limitado.

Los actos cuyos títulos van impresos en caracteres gruesos y precedidos de un asterisco son todos los demás actos.

I

(Actos cuya publicación es una condición para su aplicabilidad)

DIRECTIVA 2006/60/CE DE LA COMISIÓN**de 7 de julio de 2006**

que modifica los anexos de la Directiva 90/642/CEE del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos de trifloxistrobina, tiabendazol, abamectina, benomilo, carbendazima, tiofanato-metil, miclobutanil, glifosato, trimetilsulfonio, fenpropimorf y cloromequat

(Texto pertinente a efectos del EEE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Vista la Directiva 90/642/CEE del Consejo, de 27 de noviembre de 1990, relativa a la fijación de los contenidos máximos de residuos de plaguicidas en determinados productos de origen vegetal, incluidas las frutas y hortalizas ⁽¹⁾, y, en particular, su artículo 7,

Vista la Directiva 91/414/CEE del Consejo, de 15 de julio de 1991, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios ⁽²⁾, y, en particular, su artículo 4, apartado 1, letra f),

Considerando lo siguiente:

- (1) De conformidad con lo dispuesto en la Directiva 91/414/CEE, la autorización para el empleo de productos fitosanitarios en determinados cultivos es competencia de los Estados miembros. Las autorizaciones deben basarse en la evaluación de los efectos de estos productos en la salud humana y la sanidad animal y de su influencia en el medio ambiente. A la hora de realizar estas evaluaciones han de tenerse en cuenta factores tales como la exposición de los operarios y los transeúntes, el impacto en el medio terrestre y acuático y en la atmósfera, así como las repercusiones que puede tener para los seres humanos y los animales el consumo de los residuos presentes en los cultivos tratados.
- (2) El contenido máximo de residuos (LMR) refleja la utilización de cantidades mínimas de plaguicidas para conseguir una adecuada protección de las plantas, aplicadas de tal

modo que la cantidad de residuos sea la menor posible y toxicológicamente aceptable, en particular por lo que se refiere a la ingesta alimentaria estimada.

- (3) Los LMR de los plaguicidas contemplados en la Directiva 90/642/CEE deben estar sujetos a un seguimiento constante y pueden modificarse para tomar en consideración los usos nuevos o modificados. La Comisión ha sido informada de usos nuevos o modificados de los que se derivarán cambios en los límites de residuos de trifloxistrobina, tiabendazol, abamectina, el grupo del benomilo (benomilo, carbendazima y tiofanato-metil), miclobutanil, glifosato, trimetilsulfonio y fenpropimorf.
- (4) Acerca del cloromequat, la Comisión ha recibido información que justifica la adopción de un LMR temporal (tres años) para las peras.
- (5) La exposición continuada de los consumidores a estos plaguicidas como consecuencia de los residuos que pueden contener algunos productos alimentarios se ha determinado y evaluado de acuerdo con los procedimientos y las prácticas en uso en la Comunidad, atendiendo a las orientaciones publicadas por la Organización Mundial de la Salud ⁽³⁾. En esta evaluación se ha tenido en cuenta que la abamectina y el tiabendazol se utilizan también como medicamentos veterinarios para animales productores de alimentos y que los límites máximos de residuos de esas dos sustancias se han establecido de conformidad con las disposiciones del Reglamento (CEE) n° 2377/90 del Consejo ⁽⁴⁾. A partir de las determinaciones y evaluaciones, deben establecerse los LMR de estos plaguicidas para asegurarse de que no se supera la ingesta diaria admisible.

⁽¹⁾ DO L 350 de 14.12.1990, p. 71. Directiva modificada en último lugar por la Directiva 2006/53/CE de la Comisión (DO L 154 de 8.6.2006, p. 11).

⁽²⁾ DO L 230 de 19.8.1991, p. 1. Directiva modificada en último lugar por la Directiva 2006/45/CE de la Comisión (DO L 130 de 18.5.2006, p. 27).

⁽³⁾ Orientaciones para predecir la ingesta alimentaria de residuos de plaguicidas (revisadas), elaboradas por el programa Simuvima/Alimentos en colaboración con el Comité del Codex sobre residuos de plaguicidas y publicadas por la Organización Mundial de la Salud en 1997 (WHO/FSF/FOS/97.7).

⁽⁴⁾ DO L 224 de 18.8.1990, p. 1. Reglamento modificado en último lugar por el Reglamento (CE) n° 205/2006 de la Comisión (DO L 34 de 7.2.2006, p. 21).

(6) En el caso del benomilo, la carbendazima, el tiofanato-metil, el fenpropimorf y el clormequat, para los que existe una dosis aguda de referencia, la exposición aguda de los consumidores derivada del consumo de productos alimentarios que puedan contener residuos de estos plaguicidas se ha determinado y evaluado de acuerdo con los procedimientos y las prácticas en uso dentro de la Comunidad, atendiendo a las orientaciones publicadas por la Organización Mundial de la Salud. Se han tomado en consideración los dictámenes del Comité científico de las plantas (CCP), especialmente sus consejos y recomendaciones para la protección de los consumidores de productos alimentarios tratados con plaguicidas ⁽¹⁾. A partir de la determinación de la ingesta diaria, deben establecerse LMR de los citados plaguicidas para asegurarse de que no se supera la ingesta diaria admisible. En el caso de las otras sustancias, el análisis de la información disponible muestra que no se requiere una dosis aguda de referencia y que, por lo tanto, no es necesaria su determinación a corto plazo.

(7) Cuando los usos autorizados de los productos fitosanitarios no ocasionen niveles detectables de residuos de plaguicidas en el interior ni en la superficie de los productos alimentarios, cuando no exista ningún uso autorizado, cuando los usos autorizados por los Estados miembros no estén corroborados con los datos necesarios, o cuando determinados usos en terceros países que produzcan residuos en el interior o en la superficie de productos alimentarios comercializables en el mercado comunitario no estén corroborados con los datos necesarios, los LMR deben fijarse en el umbral de determinación analítica.

(8) Procede, por lo tanto, fijar nuevos LMR de estos plaguicidas.

(9) El establecimiento o la modificación a nivel comunitario de LMR temporales no impide que los Estados miembros establezcan LMR temporales para el glifosato, el trimetil-sulfonio y el trifloxistrobin de acuerdo con lo dispuesto en el artículo 4, apartado 1, letra f), de la Directiva 91/414/CEE y en su anexo VI. Se considera que un período de cuatro años es suficiente para autorizar usos adicionales de estas sustancias. Transcurrido ese período, los LMR temporales de la Comunidad se convierten en definitivos.

(10) Los altramuces, en los que está autorizado el uso de glifosato, se consumen como alimento en varios Estados miembros. En consecuencia, es necesario incluir una

entrada «altramuces» y establecer LMR para ellos con el fin de proteger a los consumidores de un exceso de residuos de los plaguicidas utilizados en estos alimentos.

(11) Conviene, por lo tanto, modificar en consecuencia la Directiva 90/642/CEE.

(12) Las medidas previstas en la presente Directiva se ajustan al dictamen del Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal.

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Artículo 1

La Directiva 90/642/CEE queda modificada como sigue:

- 1) En el anexo I, en el grupo 3, «Legumbres», se añade la entrada «Altramuces» de tal manera que los términos «producto entero» de la última columna abarquen las cuatro entradas.
- 2) El anexo II queda modificado según lo dispuesto en el anexo de la presente Directiva.

Artículo 2

1. Los Estados miembros adoptarán y publicarán, a más tardar el 20 de enero de 2007, las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas necesarias para dar cumplimiento a lo establecido en la presente Directiva, salvo para el grupo del benomilo y el tiofanato-metil, en cuyo caso las adoptarán y publicarán, a más tardar, el 14 de septiembre de 2006, y para el clormequat, el 31 de julio de 2006. Comunicarán inmediatamente a la Comisión el texto de dichas disposiciones, así como una tabla de correspondencias entre las mismas y la presente Directiva.

Aplicarán dichas disposiciones a partir del 21 de enero de 2007, salvo para el grupo del benomilo y el tiofanato-metil, en cuyo caso las adoptarán, a más tardar, el 15 de septiembre de 2006, y para el clormequat, el 1 de agosto de 2006.

⁽¹⁾ Dictamen sobre cuestiones relativas a la modificación de los anexos de las Directivas 86/362/CEE, 86/363/CEE y 90/642/CEE del Consejo (dictamen emitido por el CCP el 14 de julio de 1998); dictamen sobre residuos variables de plaguicidas en frutas y hortalizas (dictamen emitido por el CCP el 14 de julio de 1998); http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scp/outcome_ppp_en.html.

Cuando los Estados miembros adopten dichas disposiciones, estas harán referencia a la presente Directiva o irán acompañadas de dicha referencia en su publicación oficial. Los Estados miembros establecerán las modalidades de la mencionada referencia.

2. Los Estados miembros comunicarán a la Comisión el texto de las disposiciones básicas de Derecho interno que adopten en el ámbito regulado por la presente Directiva.

Artículo 3

La presente Directiva entrará en vigor el vigésimo día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

Artículo 4

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 7 de julio de 2006.

Por la Comisión
Markos KYPRIANOU
Miembro de la Comisión

Residuos de plaguicidas y límites máximos de residuos (mg/kg)									
Grupos y tipos de productos individuales a los que se aplican los límites máximos de residuos	Trifloxistrobin	Tiabendazol	Abamectina (suma de la avermectina B1a, la avermectina B1b y el isómero delta-8,9 de la avermectina B1a)	Suma de bennilo y carbendazima, expresada en carbendazima	Tiofanato-metil	Miclobutanil	Glifosato	Trimetilsulfonio, catión resultante del uso de glifosato	Fenpropimorf
Piñones									
Pistachos									
Nueces comunes									
Otros									
iii) FRUTOS DE PEPTA	0,5 ^(p)		0,01 ^(*)	0,2	0,5	0,5	0,1 ^(*) ^(p)	0,05 ^(*) ^(p)	0,05 ^(*)
Manzanas		5							
Peras		5							
Membrillos									
Otros		0,05 ^(*)							
iv) FRUTOS DE HUESO		0,05 ^(*)	0,01 ^(*)				0,1 ^(*) ^(p)	0,05 ^(*) ^(p)	0,05 ^(*)
Albaricoques	1 ^(p)			0,2	2	0,3			
Cerezas	1 ^(p)			0,5	0,3	1			
Melocotones (incluidas las nectarinas e híbridos similares)	1 ^(p)			0,2	2	0,5			
Ciruelas	0,2 ^(p)			0,5	0,3	0,5			
Otros	0,02 ^(*) ^(p)			0,1 ^(*)	0,1 ^(*)	0,02 ^(*)			
v) BAYAS Y FRUTAS PEQUEÑAS		0,05 ^(*)						0,05 ^(*) ^(p)	
a) Uvas de mesa y de vinificación	5 ^(p)		0,01 ^(*)			1	0,5 ^(p)		0,05 ^(*)
Uvas de mesa				0,3	0,1 ^(*)				
Uvas de vinificación				0,5	3				
b) Fresas (distintas de las silvestres)	0,5 ^(*) ^(p)		0,1	0,1 ^(*)	0,1 ^(*)	1	0,1 ^(*) ^(p)		1
c) Frutas de caña (distintas de las silvestres)	0,02 ^(*) ^(p)			0,1 ^(*)	0,1 ^(*)		0,1 ^(*) ^(p)		1
Zarzamoras			0,1			1			
Moras árticas									
Moras-frambuesas									
Frambuesas			0,1			1			
Otras			0,01 ^(*)			0,02 ^(*)			

Residuos de plaguicidas y límites máximos de residuos (mg/kg)									
Grupos y tipos de productos individuales a los que se aplican los límites máximos de residuos	Trifloxistrobin	Tiabendazol	Abamectina (suma de la avermectina B1a, la avermectina B1b y el isómero delta-8,9 de la avermectina B1a)	Suma de benomilo y carbendazima, expresada en carbendazima	Tiofanato-metil	Miclobutanil	Glifosato	Trimetilsulfonio, catión resultante del uso de glifosato	Fenpropimorf
d) Otras bayas y frutas pequeñas (distintas de las silvestres)			0,01 (*)	0,1 (*)	0,1 (*)		0,1 (*) (p)		1
Mirtillos (frutos del <i>Vaccinium Myrtillus</i>)									
Arándanos									
Grosellas [rojas, negras (casís) y blancas]	1 (p)					1			
Grosellas espinosas	1 (p)					1			
Otras	0,02 (*) (p)					0,02 (*)			
e) Bayas y frutas silvestres	0,02 (*) (p)		0,01 (*)	0,1 (*)	0,1 (*)	0,02 (*)	0,1 (*) (p)		0,05 (*)
vi) OTRAS FRUTAS			0,01 (*)						
Aguacates		15							
Plátanos	0,05 (p)	5				2			2
Dátiles									
Higos									
Kiwis									
Kumquats									
Lichis									
Mangos		5							
Aceitunas (de mesa)									
Aceitunas (para producción de aceite)							1 (p)	1 (p)	
Papayas		10		0,2	1				
Frutas de la pasión									
Piñas									
Granadas									
Otras	0,02 (*) (p)	0,05 (*)		0,1 (*)	0,1 (*)	0,02 (*)	0,1 (*) (p)	0,05 (*) (p)	0,05 (*)

Residuos de plaguicidas y límites máximos de residuos (mg/kg)									
Grupos y tipos de productos individuales a los que se aplican los límites máximos de residuos	Trifloxistrobin	Tiabendazol	Abamectina (suma de la avermectina B1a, la avermectina B1b y el isómero delta-8,9 de la avermectina B1a)	Suma de benomilo y carbendazima, expresada en carbendazima	Tiofanato-metil	Miclobutanil	Glifosato	Trimetilsulfonio, catión resultante del uso de glifosato	Fenpropimorf
2. Hortalizas, frescas o sin cocer, congeladas o desecadas									
i) RAÍCES Y TUBÉRCULOS	0,02 (*) (p)		0,01 (*)	0,1 (*)	0,1 (*)		0,1 (*) (p)	0,05 (*) (p)	0,05 (*)
Remolachas									
Zanahorias						0,2			
Mandioca		15							
Apionabos									
Rábanos rústicos						0,2			
Patacas									
Chirivías						0,2			
Perejil (raíz)						0,2			
Rábanos									
Salsifíes									
Boniatos		15							
Colinabos									
Nabos									
Ñames		15							
Otros		0,05 (*)				0,02 (*)			
ii) BULBOS	0,02 (*) (p)	0,05 (*)	0,01 (*)	0,1 (*)	0,1 (*)	0,02 (*)	0,1 (*) (p)	0,05 (*) (p)	0,05 (*)
Ajos									
Cebollas									
Chalotes									
Cebolletas									
Otros									
iii) FRUTOS Y PEPÓNIDES		0,05 (*)					0,1 (*) (p)	0,05 (*) (p)	0,05 (*)
a) Solanáceas									
Tomates	0,5 (p)		0,02	0,5	2	0,3			

	Residuos de plaguicidas y límites máximos de residuos (mg/kg)									
Grupos y tipos de productos individuales a los que se aplican los límites máximos de residuos	Trifloxistrobin	Tiabendazol	Abamectina (suma de la avermectina B1a, la avermectina B1b y el isómero delta-8,9 de la avermectina B1a)	Suma de benomilo y carbendazima, expresada en carbendazima	Tiofanato-metil	Miclobutanil	Glifosato	Trimetilsulfonio, catión resultante del uso de glifosato	Fenpropimorf	
Berzas										
Otras										
d) Colirrábanos		0,05 (*)		0,1 (*)	0,1 (*)				0,05 (*)	
v) HORTALIZAS DE HOJA Y HIERBAS AROMÁTICAS FRESCAS	0,02 (*) (p)	0,05 (*)		0,1 (*)	0,1 (*)		0,1 (*) (p)	0,05 (*) (p)	0,05 (*)	
a) Lechugas y similares			0,1							
Berros										
Canónigos (valeriana)						5				
Lechugas										
Escarolas (endivias de hoja ancha)										
Rucola										
Hojas y tallos de brassica										
Otras						0,02 (*)				
b) Espinacas y similares			0,01 (*)			0,02 (*)				
Espinacas										
Acelgas										
Otras										
c) Berros de agua			0,01 (*)			0,02 (*)				
d) Endibias		1	0,01 (*)			0,02 (*)				
e) Hierbas aromáticas			0,01 (*)			0,02 (*)				
Perifollos										
Cebollinos										
Perejil										
Hojas de apio										
Otras										
vi) LEGUMINOSAS VERDES (frescas)		0,05 (*)	0,01 (*)				0,1 (*) (p)	0,05 (*) (p)	0,05 (*)	
Judías (con vaina)	0,5 (p)			0,2	0,1 (*)	0,3				

Residuos de plaguicidas y límites máximos de residuos (mg/kg)									
Grupos y tipos de productos individuales a los que se aplican los límites máximos de residuos	Trifloxistrobin	Tiabendazol	Abamectina (suma de la avermectina B1a, la avermectina B1b y el isómero delta-8,9 de la avermectina B1a)	Suma de benomilo y carbendazima, expresada en carbendazima	Tiofanato-metil	Miclobutanil	Glifosato	Trimetilsulfonio, catión resultante del uso de glifosato	Fenpropimorf
Semillas de girasol							20 (p)		
Semillas de colza							10 (p)		
Habas de soja				0,2	0,3		20 (p)	10 (p)	
Mostaza							10 (p)		
Semillas de algodón							10 (p)		
Semillas de cáñamo									
Otras				0,1 (*)	0,1 (*)		0,1 (*) (p)	0,05 (*) (p)	
5. Patatas	0,02 (*) (p)		0,01 (*)	0,1 (*)	0,1 (*)	0,02 (*)	0,5 (p)	0,05 (*) (p)	0,05 (*)
Patatas tempranas		0,05 (*)							
Patatas para almacenar		15							
6. Té (hojas y tallos desecados, fermentados o no, de <i>Camellia sinensis</i>)	0,05 (*) (p)	0,1 (*)	0,02 (*)	0,1 (*)	0,1 (*)	0,05 (*)	2 (p)	0,05 (*) (p)	0,1 (*)
7. Lúpulo (desecado), incluidos los granulados de lúpulo y el polvo no concentrado	30 (p)	0,1 (*)	0,05	0,1 (*)	0,1 (*)	2	0,1 (*) (p)	0,05 (*) (p)	10

(*) Indica el umbral de determinación analítica.

(p) Indica que el límite máximo de residuos ha sido establecido temporalmente de conformidad con el artículo 4, apartado 1, letra f), de la Directiva 91/414/CEE.

DIRECTIVA 2006/61/CE DE LA COMISIÓN**de 7 de julio de 2006****que modifica los anexos de las Directivas 86/362/CEE, 86/363/CEE y 90/642/CEE del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos de atrazina, azinfos-etil, ciflutrin, etefon, fention, metamidofos, metomilo, paraquat y triazofos****(Texto pertinente a efectos del EEE)**

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Vista la Directiva 86/362/CEE del Consejo, de 24 de julio de 1986, relativa a la fijación de contenidos máximos para los residuos de plaguicidas sobre y en los cereales ⁽¹⁾, y, en particular, su artículo 10,

Vista la Directiva 86/363/CEE del Consejo, de 24 de julio de 1986, relativa a la fijación de contenidos máximos para los residuos de plaguicidas sobre y en los productos alimenticios de origen animal ⁽²⁾, y, en particular, su artículo 10,

Vista la Directiva 90/642/CEE del Consejo, de 27 de noviembre de 1990, relativa a la fijación de los contenidos máximos de residuos de plaguicidas en determinados productos de origen vegetal, incluidas las frutas y hortalizas ⁽³⁾, y, en particular, su artículo 7,

Vista la Directiva 91/414/CEE del Consejo, de 15 de julio de 1991, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios ⁽⁴⁾, y, en particular, su artículo 4, apartado 1, letra f),

Considerando lo siguiente:

- (1) En los cereales y los productos de origen vegetal, incluidas las frutas y hortalizas, los niveles de residuos reflejan la utilización de cantidades mínimas de plaguicidas necesarias para conseguir una protección eficaz de las plantas, aplicadas de tal modo que la cantidad de residuos sea lo más pequeña posible y toxicológicamente aceptable, teniendo en cuenta, en particular, la protección del medio ambiente y la ingesta alimentaria estimada de los consumidores. En los productos alimentarios de origen animal, los niveles de residuos reflejan el consumo por parte de

los animales de cereales y productos de origen vegetal tratados con plaguicidas y, en su caso, las consecuencias directas del uso de medicamentos veterinarios. Los límites máximos de residuos (LMR) comunitarios representan la cantidad máxima de dichos residuos que se puede esperar encontrar en los productos cuando se han respetado las buenas prácticas agrarias.

- (2) Los LMR de plaguicidas se someten a un seguimiento constante y se modifican a la luz de las nuevas informaciones y datos disponibles. Los LMR se fijan en el umbral de determinación analítica cuando los usos autorizados de los productos fitosanitarios no ocasionan niveles detectables de residuos de plaguicidas en el interior ni en la superficie de los productos alimentarios, cuando no existe ningún uso autorizado, cuando los usos autorizados por los Estados miembros no están corroborados con los datos necesarios, o cuando usos en terceros países que produzcan residuos en el interior o en la superficie de productos alimentarios comercializables en el mercado comunitario no están corroborados con los datos necesarios.

- (3) Se ha informado a la Comisión de que puede ser necesario revisar los LMR en vigor de varios plaguicidas a raíz de los nuevos datos disponibles sobre toxicología e ingesta de los consumidores. La Comisión ha pedido a los Estados miembros ponentes correspondientes que hagan propuestas para la revisión de los LMR comunitarios. Estas propuestas han sido presentadas a la Comisión.

- (4) La exposición de los consumidores, a lo largo de su vida y a corto plazo, a los plaguicidas mencionados en la presente Directiva por el consumo de los productos alimentarios se ha vuelto a determinar y a evaluar de acuerdo con los procedimientos y prácticas comunitarios, atendiendo a las orientaciones publicadas por la Organización Mundial de la Salud ⁽⁵⁾. Sobre esa base, procede fijar nuevos límites máximos de residuos que garanticen que no se produzca una exposición inadmisibles de los consumidores.

⁽¹⁾ DO L 221 de 7.8.1986, p. 37. Directiva modificada en último lugar por la Directiva 2006/59/CE de la Comisión (DO L 175 de 29.6.2006, p. 61).

⁽²⁾ DO L 221 de 7.8.1986, p. 43. Directiva modificada en último lugar por la Directiva 2006/59/CE de la Comisión.

⁽³⁾ DO L 350 de 14.12.1990, p. 71. Directiva modificada en último lugar por la Directiva 2006/59/CE de la Comisión.

⁽⁴⁾ DO L 230 de 19.8.1991, p. 1. Directiva modificada en último lugar por la Directiva 2006/45/CE de la Comisión (DO L 130 de 18.5.2006, p. 27).

⁽⁵⁾ Orientaciones para predecir la ingesta alimentaria de residuos de plaguicidas (revisadas), elaboradas por el programa Simuvima/Alimentos en colaboración con el Comité del Codex sobre residuos de plaguicidas y publicadas por la Organización Mundial de la Salud en 1997 (WHO/FSF/FOS/97.7).

- (5) En los casos pertinentes, se ha determinado y evaluado la exposición aguda de los consumidores a estos plaguicidas por el consumo de cada uno de los productos alimentarios que pueden contener sus residuos, de acuerdo con los procedimientos y prácticas comunitarios, atendiendo a las orientaciones publicadas por la Organización Mundial de la Salud. Se ha llegado a la conclusión de que la presencia de residuos de plaguicidas que no superen los nuevos LMR no causará efectos tóxicos agudos.
- (6) A través de la Organización Mundial del Comercio se ha consultado a los socios comerciales de la Comunidad acerca de los nuevos LMR y sus observaciones han recibido la debida consideración.
- (7) Por lo tanto, procede modificar en consecuencia los anexos de las Directivas 86/362/CEE, 86/363/CEE y 90/642/CEE.
- (8) Las medidas previstas en la presente Directiva se ajustan al dictamen del Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal.

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Artículo 1

El anexo II de la Directiva 86/362/CEE queda modificado con arreglo a lo dispuesto en el anexo I de la presente Directiva.

Artículo 2

El anexo II de la Directiva 86/363/CEE queda modificado con arreglo a lo dispuesto en el anexo II de la presente Directiva.

Artículo 3

El anexo II de la Directiva 90/642/CEE queda modificado con arreglo a lo dispuesto en el anexo III de la presente Directiva.

Artículo 4

1. Los Estados miembros adoptarán y publicarán, a más tardar el 20 de enero de 2007, las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas necesarias para dar cumplimiento a lo establecido en la presente Directiva. Comunicarán inmediatamente a la Comisión el texto de dichas disposiciones, así como una tabla de correspondencias entre las mismas y la presente Directiva.

Aplicarán dichas disposiciones a partir del 21 de enero de 2007.

Cuando los Estados miembros adopten dichas disposiciones, estas harán referencia a la presente Directiva o irán acompañadas de dicha referencia en su publicación oficial. Los Estados miembros establecerán las modalidades de la mencionada referencia.

2. Los Estados miembros comunicarán a la Comisión el texto de las disposiciones básicas de Derecho interno que adopten en el ámbito regulado por la presente Directiva.

Artículo 5

La presente Directiva entrará en vigor el vigésimo día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

Artículo 6

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 7 de julio de 2006.

Por la Comisión

Markos KYPRIANOU

Miembro de la Comisión

ANEXO I

En el anexo II de la Directiva 86/362/CEE, la parte A queda modificada como sigue:

- 1) Se añade la siguiente línea para la atrazina:

Residuos de plaguicidas	Límites máximos en mg/kg
«Atrazina	0,05 (*) CEREALES
(*) Indica el umbral de determinación analítica.»	

- 2) Las líneas correspondientes al azinfos-etil, al etefon y al triazofos se sustituyen por el texto siguiente:

Residuos de plaguicidas	Límites máximos en mg/kg
«Azinfos-etil	0,05 (*) CEREALES
Etefon	0,5 cebada y centeno 0,2 tritical y trigo 0,05 (*) cereales y otros
Triazofos	0,02 (*) CEREALES
(*) Indica el umbral de determinación analítica.»	

ANEXO II

En el anexo II de la Directiva 86/363/CEE, la parte A queda modificada como sigue:

- 1) Las líneas correspondientes al azinfos-etil y al triazofos se sustituyen por el texto siguiente:

Residuos de plaguicidas	Límites máximos en mg/kg		
	para la materia grasa contenida en las carnes, los preparados de carnes, los despojos y las grasas animales que figuran en las partidas ex 0201, 0202, 0203, 0204, 0205 00 00, 0206, 0207, ex 0208, 0209 00, 0210, 1601 00 y 1602 del anexo I (1) (4)	para la leche de vaca y la leche de vaca entera que figuran en la partida 0401 del anexo I; para los demás productos alimenticios de las partidas 0401, 0402, 0405 00 y 0406 de conformidad con (2) (4)	para los huevos frescos sin cascarón, los huevos de ave y las yemas de huevo que figuran en las partidas 0407 00 y 0408 del anexo I (3) (4)
«Azinfos-etil	0,01 (*)	0,01 (*)	0,01 (*)
Triazofos	0,01 (*)	0,01 (*)	0,01 (*)

(*) Indica el umbral de determinación analítica.»

- 2) Se añade la siguiente línea relativa al fention:

Residuos de plaguicidas	Límites máximos en mg/kg		
	para la materia grasa contenida en las carnes, los preparados de carnes, los despojos y las grasas animales que figuran en las partidas ex 0201, 0202, 0203, 0204, 0205 00 00, 0206, 0207, ex 0208, 0209 00, 0210, 1601 00 y 1602 del anexo I (1) (4)	para la leche de vaca y la leche de vaca entera que figuran en la partida 0401 del anexo I; para los demás productos alimenticios de las partidas 0401, 0402, 0405 00 y 0406 de conformidad con (2) (4)	para los huevos frescos sin cascarón, los huevos de ave y las yemas de huevo que figuran en las partidas 0407 00 y 0408 del anexo I (3) (4)
«Fention y su análogo oxigenado, y sus sulfóxidos y sulfonas expresados como fention	0,05 (*)	0,01 (*)	

(*) Indica el umbral de determinación analítica.»

ANEXO III

En el anexo II de la Directiva 90/642/CEE, la parte A queda modificada como sigue:

- 1) Se añade la columna siguiente relativa al fention:

Grupos y tipos de productos individuales a los que se aplican los límites máximos de residuos	Fention y su análogo oxigenado, y sus sulfóxidos y sulfonas expresados como fention
«1. Frutas frescas, desecadas o sin cocer, congeladas y sin adición de azúcar; frutos de cáscara	
i) CÍTRICOS	3
Pomelos	
Limonos	
Limas	
Mandarinas (incluidas las clementinas e híbridos similares)	
Naranjas	
Toronjas	
Otros	
ii) FRUTOS DE CÁSCARA (mondados o no)	0,01 (*)
Almendras	
Nueces de Brasil	
Anacardos	
Castañas	
Cocos	
Avellanas	
Macadamias	
Pacanas	
Piñones	
Pistachos	
Nueces comunes	
Otros	
iii) FRUTOS DE PEPITA	0,01 (*)
Manzanas	
Peras	
Membrillos	
Otros	
iv) FRUTOS DE HUESO	
Albaricoques	
Cerezas	2
Melocotones (incluidas las nectarinas e híbridos similares)	
Ciruelas	
Otros	0,01 (*)
v) BAYAS Y FRUTAS PEQUEÑAS	0,01 (*)
a) Uvas de mesa y de vinificación	
Uvas de mesa	
Uvas de vinificación	
b) Fresas (distintas de las silvestres)	

Grupos y tipos de productos individuales a los que se aplican los límites máximos de residuos	Fention y su análogo oxigenado, y sus sulfóxidos y sulfonas expresados como fention
c) Frutas de caña (distintas de las silvestres)	
Zarzamoras	
Moras árticas	
Moras-frambuesas	
Frambuesas	
Otras	
d) Otras bayas y frutas pequeñas (distintas de las silvestres)	
Mirtillos (frutos del <i>Vaccinium Myrtillus</i>)	
Arándanos	
Grosellas [rojas, negras (casís) y blancas]	
Grosellas espinosas	
Otras	
e) Bayas y frutas silvestres	
vi) OTRAS FRUTAS	
Aguacates	
Plátanos	
Dátiles	
Higos	
Kiwis	
Kumquats	
Lichis	
Mangos	
Aceitunas (de mesa)	1
Aceitunas (para producción de aceite)	1
Papayas	
Frutas de la pasión	
Piñas	
Otras	0,01 (*)
2. Hortalizas, frescas o sin cocer, congeladas o desecadas	0,01 (*)
i) RAÍCES Y TUBÉRCULOS	
Remolachas	
Zanahorias	
Mandioca	
Apionabos	
Rábanos rusticanos	
Patacas	
Chirivías	
Perejil (raíz)	
Rábanos	
Salsifíes	
Boniatos	
Colinabos	
Nabos	

Grupos y tipos de productos individuales a los que se aplican los límites máximos de residuos	Fention y su análogo oxigenado, y sus sulfóxidos y sulfonas expresados como fention
Ñames	
Otros	
ii) BULBOS	
Ajos	
Cebollas	
Chalotes	
Cebolletas	
Otros	
iii) FRUTOS Y PEPÓNIDES	
a) Solanáceas	
Tomates	
Pimientos	
Berenjenas	
Quingombó	
Otras	
b) Cucurbitáceas de piel comestible	
Pepinos	
Pepinillos	
Calabacines	
Otras	
c) Cucurbitáceas de piel no comestible	
Melones	
Calabazas	
Sandías	
Otras	
d) Maíz dulce	
iv) HORTALIZAS DEL GÉNERO BRASSICA	
a) Inflorescencias	
Brécoles	
Coliflores	
Otras	
b) Cogollos	
Coles de Bruselas	
Repollos	
Otros	
c) Hojas	
Coles de China	
Berzas	
Otras	
d) Colirrábanos	
v) HORTALIZAS DE HOJA Y HIERBAS AROMÁTICAS FRESCAS	
a) Lechugas y similares	
Berros	

Grupos y tipos de productos individuales a los que se aplican los límites máximos de residuos	Fention y su análogo oxigenado, y sus sulfóxidos y sulfonas expresados como fention
Canónigos (valeriana)	
Lechugas	
Escarolas	
Rucola	
Hojas y tallos de brassica	
Otras	
b) Espinacas y similares	
Espinacas	
Acelgas	
Otras	
c) Berros de agua	
d) Endibias	
e) Hierbas aromáticas	
Perifollos	
Cebollinos	
Perejil	
Hojas de apio	
Otras	
vi) LEGUMINOSAS VERDES (frescas)	
Judías (con vaina)	
Judías (sin vaina)	
Guisantes (con vaina)	
Guisantes (sin vaina)	
Otras	
vii) TALLOS JÓVENES (frescos)	
Espárragos	
Cardos comestibles	
Apios	
Hinojos	
Alcachofas	
Puerros	
Ruibarbos	
Otros	
viii) HONGOS Y SETAS	
a) Setas cultivadas	
b) Setas silvestres	
3. Legumbres	0,01 (*)
Judías	
Lentejas	
Guisantes	

Grupos y tipos de productos individuales a los que se aplican los límites máximos de residuos	Fention y su análogo oxigenado, y sus sulfóxidos y sulfonas expresados como fention
Otras	
4. Semillas oleaginosas	0,02 (*)
Semillas de lino	
Cacahuetes	
Semillas de adormidera	
Semillas de sésamo	
Semillas de girasol	
Semillas de colza	
Habas de soja	
Mostaza	
Semillas de algodón	
Semillas de cáñamo	
Otras	
5. Patatas	0,01 (*)
Patatas tempranas	
Patatas para almacenar	
6. Té (hojas y tallos desecados, fermentados o no, de <i>Camellia sinensis</i>)	0,1 (*)
7. Lúpulo (desecado), incluidos los granulados de lúpulo y el polvo no concentrado	0,1 (*)
(*) Indica el umbral de determinación analítica.»	

- 2) Las columnas relativas a la atrazina, el azinfos-etil, el ciflutrin, el etefon, el metamidofos, el metomilo, el paraquat y el triazofos se sustituyen por el texto siguiente:

Grupos y tipos de productos individuales a los que se aplican los límites máximos de residuos	Atrazina	Azinfos-etil	Ciflutrin, incluidas otras mezclas de isómeros constituyentes (suma de isómeros)	Etefon	Metamidofos	Metomilo/Tiodicarb (suma expresada como metomilo)	Paraquat	Triazofos
«1. Frutas frescas, desecadas o sin cocer, congeladas y sin adición de azúcar; frutos de cáscara	0,05 (*)	0,02 (*)					0,02 (*)	0,01 (*)
i) CÍTRICOS			0,02 (*)	0,05 (*)	0,01 (*)			
Pomelos						0,5		
Limones						1		
Limas						1		
Mandarinas (incluidas las clementinas e híbridos similares)						1		
Naranjas						0,5		
Toronjas						0,5		
Otros						0,05 (*)		

Grupos y tipos de productos individuales a los que se aplican los límites máximos de residuos	Atrazina	Azinfos-etil	Ciflutrin, incluidas otras mezclas de isómeros constituyentes (suma de isómeros)	Etefon	Metamidofós	Metomilo/Tiodicarb (suma expresada como metomilo)	Paraquat	Triazofós
ii) FRUTOS DE CÁSCARA (mondados o no)			0,02 (*)	0,1	0,01 (*)	0,05 (*)		
Almendras								
Nueces de Brasil								
Anacardos								
Castañas								
Cocos								
Avellanas								
Macadamias								
Pacanas								
Piñones								
Pistachos								
Nueces comunes								
Otros								
iii) FRUTOS DE PEPITA			0,2		0,01 (*)	0,2		
Manzanas				0,5				
Peras								
Membrillos								
Otros				0,05 (*)				
iv) FRUTOS DE HUESO								
Albaricoques			0,3		0,1	0,2		
Cerezas			0,2	3		0,1		
Melocotones (incluidas las nectarinas e híbridos similares)			0,3		0,05	0,2		
Ciruelas			0,2			0,5		
Otros			0,02 (*)	0,05 (*)	0,01 (*)	0,05 (*)		
v) BAYAS Y FRUTAS PEQUEÑAS					0,01 (*)			
a) Uvas de mesa y de vinificación			0,3	1				
Uvas de mesa						0,05 (*)		
Uvas de vinificación						1		
b) Fresas (distintas de las silvestres)			0,02 (*)	0,05 (*)		0,05 (*)		
c) Frutas de caña (distintas de las silvestres)			0,02 (*)	0,05 (*)		0,05 (*)		
Zarzamoras								
Moras árticas								

Grupos y tipos de productos individuales a los que se aplican los límites máximos de residuos	Atrazina	Azinfos-etil	Ciflutrin, incluidas otras mezclas de isómeros constituyentes (suma de isómeros)	Etefon	Metamidófos	Metomilo/Tiodicarb (suma expresada como metomilo)	Paraquat	Triazofos
Moras-frambuesas								
Frambuesas								
Otras								
d) Otras bayas y frutas pequeñas (distintas de las silvestres)			0,02 (*)			0,05 (*)		
Mirtillos (frutos del <i>Vaccinium Myrtillus</i>)								
Arándanos								
Grosellas [rojas, negras (casís) y blancas]				5				
Grosellas espinosas								
Otras				0,05 (*)				
e) Bayas y frutas silvestres			0,02 (*)	0,05 (*)		0,05 (*)		
vi) OTRAS FRUTAS			0,02 (*)		0,01 (*)	0,05 (*)		
Aguacates								
Plátanos								
Dátiles								
Higos								
Kiwis								
Kumquats								
Lichis								
Mangos								
Aceitunas (de mesa)								
Aceitunas (para producción de aceite)								
Papayas								
Frutas de la pasión								
Piñas				2				
Otras				0,05 (*)				
2. Hortalizas, frescas o sin cocer, congeladas o desecadas		0,02 (*)					0,02 (*)	0,01 (*)
i) RAÍCES Y TUBÉRCULOS	0,05 (*)		0,02 (*)	0,05 (*)	0,01 (*)			
Remolachas								
Zanahorias								
Mandioca								
Apionabos								
Rábanos rusticanos								

Grupos y tipos de productos individuales a los que se aplican los límites máximos de residuos	Atrazina	Azinfos-etil	Ciflutrin, incluidas otras mezclas de isómeros constituyentes (suma de isómeros)	Etefon	Metamidofos	Metomilo/Tiodicarb (suma expresada como metomilo)	Paraquat	Triazofos
Patacas								
Chirivías								
Perejil (raíz)								
Rábanos						0,5		
Salsifíes								
Boniatos								
Colinabos								
Nabos								
Ñames								
Otros						0,05 (*)		
ii) BULBOS	0,05 (*)		0,02 (*)	0,05 (*)	0,01 (*)	0,05 (*)		
Ajos								
Cebollas								
Chalotes								
Cebolletas								
Otros								
iii) FRUTOS Y PEPÓNIDES					0,01 (*)			
a) Solanáceas	0,05 (*)							
Tomates			0,05	1		0,2		
Pimientos			0,3	3				
Berenjenas						0,2		
Quingombó								
Otras			0,02 (*)	0,05 (*)		0,05 (*)		
b) Cucurbitáceas de piel comestible	0,05 (*)			0,05 (*)		0,05 (*)		
Pepinos			0,1					
Pepinillos								
Calabacines								
Otras			0,02 (*)					
c) Cucurbitáceas de piel no comestible	0,05 (*)		0,02 (*)	0,05 (*)		0,05 (*)		
Melones								
Calabazas								
Sandías								
Otras								

Grupos y tipos de productos individuales a los que se aplican los límites máximos de residuos	Atrazina	Azinfos-etil	Ciflutrin, incluidas otras mezclas de isómeros constituyentes (suma de isómeros)	Etefon	Metamidófos	Metomilo/Tiodicarb (suma expresada como metomilo)	Paraquat	Triazófos
d) Maíz dulce	0,1		0,02 (*)	0,05 (*)		0,05 (*)		
iv) HORTALIZAS DEL GÉNERO BRASSICA	0,05 (*)			0,05 (*)				
a) Inflorescencias			0,05		0,02			
Brécoles						0,2		
Coliflores								
Otras						0,05 (*)		
b) Cogollos			0,2		0,01 (*)	0,05 (*)		
Coles de Bruselas								
Repollos								
Otros								
c) Hojas			0,3		0,01 (*)	0,05 (*)		
Coles de China								
Berzas								
Otras								
d) Colirrábanos			0,02 (*)		0,01 (*)	0,05 (*)		
v) HORTALIZAS DE HOJA Y HIERBAS AROMÁTICAS FRES-CAS	0,05 (*)			0,05 (*)	0,01 (*)			
a) Lechugas y similares			0,5					
Berros								
Canónigos (valeriana)								
Lechugas						0,3		
Escarolas								
Ruccola								
Hojas y tallos de brassica								
Otras						0,05 (*)		
b) Espinacas y similares			0,02 (*)					
Espinacas						0,05		
Acelgas								
Otras						0,05 (*)		
c) Berros de agua			0,02 (*)			0,05 (*)		
d) Endibias			0,02 (*)			0,05 (*)		
e) Hierbas aromáticas			0,02 (*)			0,3		
Perifollos								
Cebollinos								
Perejil								

Grupos y tipos de productos individuales a los que se aplican los límites máximos de residuos	Atrazina	Azinfos-etil	Ciflutrin, incluidas otras mezclas de isómeros constituyentes (suma de isómeros)	Etefon	Metamidofos	Metomilo/Tiodicarb (suma expresada como metomilo)	Paraquat	Triazofos
Hojas de apio								
Otras								
vi) LEGUMINOSAS VERDES (frescas)	0,05 (*)		0,05	0,05 (*)		0,05 (*)		
Judías (con vaina)					0,5			
Judías (sin vaina)								
Guisantes (con vaina)					0,5			
Guisantes (sin vaina)								
Otras					0,01 (*)			
vii) TALLOS JÓVENES (frescos)	0,05 (*)		0,02 (*)	0,05 (*)		0,05 (*)		
Espárragos								
Cardos comestibles								
Apios								
Hinojos								
Alcachofas					0,1			
Puerros								
Ruibarbos								
Otros					0,01 (*)			
viii) HONGOS Y SETAS	0,05 (*)		0,02 (*)	0,05 (*)	0,01 (*)	0,05 (*)		
a) Setas cultivadas								
b) Setas silvestres								
3. Legumbres	0,05 (*)	0,02 (*)	0,02 (*)	0,05 (*)	0,01 (*)	0,05 (*)	0,02 (*)	0,01 (*)
Judías								
Lentejas								
Guisantes								
Otras								
4. Semillas oleaginosas	0,05 (*)	0,02 (*)					0,02 (*)	0,01 (*)
Semillas de lino								
Cacahuetes						0,1		
Semillas de adormidera								
Semillas de sésamo								
Semillas de girasol								
Semillas de colza			0,05					
Habas de soja					0,2	0,1		
Mostaza								
Semillas de algodón				2	0,2	0,1		
Semillas de cáñamo								
Otras			0,02 (*)	0,1 (*)	0,01 (*)	0,05 (*)		

Grupos y tipos de productos individuales a los que se aplican los límites máximos de residuos	Atrazina	Azinfos-étil	Ciflutrin, incluidas otras mezclas de isómeros constituyentes (suma de isómeros)	Etefon	Metamidófos	Metomilo/Tiodicarb (suma expresada como metomilo)	Paraquat	Triazofos
5. Patatas	0,05 (*)	0,02 (*)	0,02 (*)	0,05 (*)	0,01 (*)	0,05 (*)	0,02 (*)	0,01 (*)
Patatas tempranas								
Patatas para almacenar								
6. Té (hojas y tallos desecados, fermentados o no, de <i>Camellia sinensis</i>)	0,1 (*)	0,05 (*)	0,1 (*)	0,1 (*)	0,02 (*)	0,1 (*)	0,05 (*)	0,02 (*)
7. Lúpulo (desecado), incluidos los granulados de lúpulo y el polvo no concentrado	0,1 (*)	0,05 (*)	20	0,1 (*)	0,02 (*)	10	0,05 (*)	0,02 (*)

(*) Indica el umbral de determinación analítica.»

DIRECTIVA 2006/62/CE DE LA COMISIÓN**de 12 de julio de 2006****por la que se modifican los anexos de las Directivas 76/895/CEE, 86/362/CEE, 86/363/CEE y 90/642/CEE del Consejo en lo relativo a los contenidos máximos de desmedifam, fenmedifam y clorfenvinfós****(Texto pertinente a efectos del EEE)**

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Vista la Directiva 76/895/CEE del Consejo, de 23 de noviembre de 1976, relativa a la fijación de los contenidos máximos de residuos de plaguicidas en las frutas y hortalizas ⁽¹⁾, y, en particular, su artículo 5,

Vista la Directiva 86/362/CEE del Consejo, de 24 de julio de 1986, relativa a la fijación de contenidos máximos para los residuos de plaguicidas sobre y en los cereales ⁽²⁾, y, en particular, su artículo 10,

Vista la Directiva 86/363/CEE del Consejo, de 24 de julio de 1986, relativa a la fijación de contenidos máximos para los residuos de plaguicidas sobre y en los productos alimenticios de origen animal ⁽³⁾, y, en particular, su artículo 10,

Vista la Directiva 90/642/CEE del Consejo, de 27 de noviembre de 1990, relativa a la fijación de los contenidos máximos de residuos de plaguicidas en determinados productos de origen vegetal, incluidas las frutas y hortalizas ⁽⁴⁾, y, en particular, su artículo 7,

Vista la Directiva 91/414/CEE del Consejo, de 15 de julio de 1991, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios ⁽⁵⁾, y, en particular, su artículo 4, apartado 1, letra f),

Considerando lo siguiente:

- (1) Las sustancias activas existentes desmedifam y fenmedifam se incluyeron en el anexo I de la Directiva 91/414/CEE mediante la Directiva 2004/58/CE de la Comisión ⁽⁶⁾.

⁽¹⁾ DO L 340 de 9.12.1976, p. 26. Directiva modificada en último lugar por la Directiva 2006/59/CE de la Comisión (DO L 175 de 29.6.2006, p. 61).

⁽²⁾ DO L 221 de 7.8.1986, p. 37. Directiva modificada en último lugar por la Directiva 2006/59/CE.

⁽³⁾ DO L 221 de 7.8.1986, p. 43. Directiva modificada en último lugar por la Directiva 2006/59/CE de la Comisión.

⁽⁴⁾ DO L 350 de 14.12.1990, p. 71. Directiva modificada en último lugar por la Directiva 2006/59/CE de la Comisión.

⁽⁵⁾ DO L 230 de 19.8.1991, p. 1. Directiva modificada en último lugar por la Directiva 2006/45/CE de la Comisión (DO L 130 de 18.5.2006, p. 27).

⁽⁶⁾ DO L 120 de 24.4.2004, p. 26.

- (2) La inclusión en el anexo I de la Directiva 91/414/CEE de estas sustancias activas se basó en la evaluación de la información presentada acerca del uso propuesto. Con arreglo al artículo 4, apartado 1, letra f), de la Directiva 91/414/CEE, algunos Estados miembros han presentado información sobre este uso. La información disponible ha sido revisada y es suficiente para permitir fijar determinados límites máximos de residuos (LMR).

- (3) Por lo que se refiere al clorfenvinfós, mediante el Reglamento (CE) n° 2076/2002 de la Comisión ⁽⁷⁾, se ha decidido no incluir dicha sustancia en el anexo I de la Directiva 91/414/CEE. Determinados Estados miembros pueden mantener ciertas autorizaciones relativas al uso de productos que contienen clorfenvinfós vigentes hasta el 30 de junio de 2007.

- (4) En la Directiva 76/895/CEE ya se establecen LMR comunitarios para el clorfenvinfós, que deberían tenerse en cuenta al establecer los LMR para el clorfenvinfós en la Directiva 90/642/CEE.

- (5) Los informes de revisión de la Comisión que se prepararon para incluir en el anexo I de la Directiva 91/414/CEE las citadas sustancias activas establecen la ingesta diaria aceptable (IDA) y, en caso necesario, la dosis de referencia aguda (DRA) para dichas sustancias. La exposición de los consumidores de productos alimenticios tratados con las sustancias activas consideradas se ha evaluado de acuerdo con los procedimientos comunitarios y atendiendo a las orientaciones publicadas por la Organización Mundial de la Salud ⁽⁸⁾ y al dictamen del Comité científico de las plantas ⁽⁹⁾ sobre la metodología empleada. Se ha concluido que los LMR propuestos no darán lugar a que se sobrepasen dichas IDA o DRA.

⁽⁷⁾ DO L 319 de 23.11.2002, p. 3. Reglamento modificado en último lugar por el Reglamento (CE) n° 1335/2005 (DO L 211 de 13.8.2005, p. 6).

⁽⁸⁾ Orientaciones para predecir la ingesta alimentaria de residuos de plaguicidas (versión revisada), elaboradas por el programa SIMUVIMA/Alimentos en colaboración con el Comité del Codex sobre residuos de plaguicidas y publicadas por la Organización Mundial de la Salud en 1997 (WHO/FSF/FOS/97.7).

⁽⁹⁾ Dictamen del Comité científico de las plantas sobre cuestiones relativas a la modificación de los anexos de las Directivas 86/362/CEE, 86/363/CEE y 90/642/CEE del Consejo (Dictamen emitido por el Comité científico de las plantas el 14 de julio de 1998) (http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/index_en.html).

- (6) A fin de proteger convenientemente al consumidor frente al riesgo de exposición a residuos derivado de una utilización no autorizada de productos fitosanitarios, deben establecerse LMR provisionales para las combinaciones de producto/plaguicida correspondientes en el límite inferior de determinación analítica.
- (7) La fijación a escala comunitaria de tales LMR provisionales no impide a los Estados miembros establecer LMR provisionales de las sustancias en cuestión, de conformidad con lo previsto en el artículo 4, apartado 1, letra f) de la Directiva 91/414/CEE, así como en su anexo VI. Se considera que un periodo de cuatro años es suficiente para permitir los usos adicionales de la sustancia activa en cuestión. Después, los LMR provisionales deberían pasar a ser definitivos.
- (8) Es necesario, por lo tanto, incluir en los anexos de las Directivas 86/362/CEE, 86/363/CEE y 90/642/CEE todos los LMR derivados de la utilización de estos productos fitosanitarios, con objeto de permitir una vigilancia y un control adecuados de la prohibición de su utilización y proteger al consumidor. En caso de que hasta la fecha no se hayan definido LMR, éstos deben fijarse por primera vez.
- (9) Procede, pues, suprimir las disposiciones de la Directiva 76/895/CEE que establecen LMR para el clorfenvinfós.
- (10) Las Directivas 76/895/CEE, 86/362/CEE, 86/363/CEE y 90/642/CEE deberían modificarse en consecuencia.
- (11) Las medidas previstas en la presente Directiva se ajustan al dictamen del Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal.

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Artículo 1

En el anexo II de la Directiva 76/895/CEE, se suprimirá la línea correspondiente al clorfenvinfós.

Artículo 2

El anexo II de la Directiva 86/362/CE queda modificado con arreglo a lo dispuesto en el anexo I de la presente Directiva.

Artículo 3

El anexo II de la Directiva 86/363/CE queda modificado con arreglo a lo dispuesto en el anexo II de la presente Directiva.

Artículo 4

El anexo II de la Directiva 90/642/CE queda modificado con arreglo a lo dispuesto en el anexo III de la presente Directiva.

Artículo 5

1. Los Estados miembros adoptarán y publicarán, a más tardar el 20 de enero de 2008, las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas necesarias para ajustarse a lo dispuesto en la presente Directiva. Comunicarán inmediatamente a la Comisión el texto de dichas disposiciones, así como una tabla de correspondencias entre las mismas y la presente Directiva.

Aplicarán dichas disposiciones a partir del 21 de enero de 2008.

Cuando los Estados miembros adopten tales disposiciones, éstas harán referencia a la presente Directiva o irán acompañadas de dicha referencia en su publicación oficial. Los Estados miembros establecerán las modalidades de la mencionada referencia.

2. Los Estados miembros comunicarán a la Comisión el texto de las disposiciones básicas de Derecho interno que adopten en el ámbito regulado por la presente Directiva.

Artículo 6

La presente Directiva entrará en vigor el vigésimo día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

Artículo 7

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 12 de julio de 2006.

Por la Comisión

Markos KYPRIANOU

Miembro de la Comisión

ANEXO I

En la parte A del anexo II de la Directiva 86/362/CEE se añaden las líneas siguientes relativas a las sustancias desmedifam, fenmedifam y clorfenvinfós:

Residuos de plaguicidas	Contenidos máximos en mg/kg
«Desmedifam	0,05 (*) (P) cereales
Fenmedifam	0,05 (*) (P) cereales
clorfenvinfós (suma de isómeros E y Z)	0,02 (*) cereales

(*) Indica el nivel más bajo de determinación analítica.

(P) Indica que el límite máximo de residuos ha sido establecido provisionalmente, de conformidad con el artículo 4, apartado 1, letra f), de la Directiva 91/414/CEE.»

ANEXO II

El anexo II de la Directiva 86/363/CEE queda modificado como sigue:

- 1) En la parte A se añade la línea siguiente relativa al clorfenvinfós:

Residuos de plaguicidas	Contenidos máximos en mg/kg		
	En la materia grasa contenida en las carnes, preparados de carnes, despojos y grasas animales que figuran, en las partidas ex 0201, 0202, 0203, 0204, 0205 00 00, 0206, 0207, ex 0208, 0209 00, 0210, 1601 00 y 1602 del anexo I (1) (4)	En la leche de vaca y en la leche entera de vaca que figuran en el anexo I, en las partidas 0401; en relación con otros productos alimenticios, en las partidas 0401, 0402, 0405 00 y 0406 de conformidad con (2) (4)	En los huevos frescos sin cascarón, huevos de ave y yemas de huevo que figuran en el anexo I en las partidas 0407 00 y 0408 (3) (4)
«clorfenvinfós (suma de isómeros E y Z)	0,01 (*)	0,01 (*)	0,01 (*)

(*) Indica el nivel más bajo de determinación analítica.».

- 2) En la parte B se añade la siguiente línea relativa al fenmedifam:

Residuos de plaguicidas	Contenidos máximos en mg/kg		
	En las carnes, incluida la materia grasa, los preparados de carne, los despojos y las grasas animales que figuran en las partidas 0201, 0202, 0203, 0204, 0205 00 00, 0206, 0207, ex 0208, 0209 00, 0210, 1601 00 y 1602 del anexo I	En la leche y los productos lácteos de las partidas 0401, 0402, 0405 00 y 0406 del anexo I	En los huevos frescos sin cascarón, los huevos de ave y las yemas de huevo que figuran en las partidas 0407 00 y 0408 del anexo I
«fenmedifam (Metil-N-(3-hidroxifenil) carbamato (MHPC), expresados como fenmedifam)	0,05 (*) (P)	0,05 (*) (P)	0,05 (*) (P)

(*) Indica el nivel más bajo de determinación analítica.

(P) Indica el límite máximo de residuos establecido provisionalmente, de conformidad con el artículo 4, apartado 1, letra f), de la Directiva 91/414/CEE: salvo que se modifique, este nivel será definitivo a partir del 9 de agosto de 2010.».

ANEXO III

En la parte A del anexo II de la Directiva 90/642/CEE, se añaden las columnas siguientes relativas a las sustancias desmedifam, fenmedifam y clorfenvinfós:

Residuos de plaguicidas y contenidos máximos de residuos (mg/kg)			
Grupos y ejemplos de productos a los que se aplican los contenidos máximos de residuos	Desmedifam	Fenmedifam	clorfenvinfós (suma de isómeros E y Z)
«1. Frutas frescas, desecadas o sin cocer, congeladas y sin adición de azúcar; frutos de cáscara	0,05 (*) (p)		0,02 (*)
i) CÍTRICOS		0,05 (*) (p)	
Pomelos			
Limones			
Limas			
Mandarinas (incluidos las clementinas e híbridos similares)			
Naranjas			
Toronjas			
Otros			
ii) FRUTOS DE CÁSCARA (mondados o no)		0,05 (*) (p)	
Almendras			
Nueces del Brasil			
Anacardos			
Castañas			
Cocos			
Avellanas			
Macadamias			
Pacanas			
Piñones			
Pistachos			
Nueces comunes			
Otros			
iii) FRUTOS DE PEPITA		0,05 (*) (p)	
Manzanas			
Peras			
Membrillos			
Otros			
iv) FRUTOS DE HUESO		0,05 (*) (p)	
Albaricoques			
Cerezas			
Melocotones (incluidos las nectarinas e híbridos similares)			
Ciruelas			
Otros			
v) BAYAS Y FRUTAS PEQUEÑAS			
a) Uvas de mesa y de vinificación		0,05 (*) (p)	
Uvas de mesa			
Uvas de vinificación			

Residuos de plaguicidas y contenidos máximos de residuos (mg/kg)			
Grupos y ejemplos de productos a los que se aplican los contenidos máximos de residuos	Desmedifam	Fenmedifam	clorfenvinfós (suma de isómeros E y Z)
b) Fresas (distintas de las silvestres)		0,1 (*) (P)	
c) Frutas de caña (distintas de las silvestres)		0,05 (*) (P)	
Zarzamoras			
Moras árticas			
Moras-frambuesas			
Frambuesas			
Otros			
d) Otras bayas y frutas pequeñas (distintas de las silvestres)		0,05 (*) (P)	
Mirtilos (frutos del <i>Vaccinium myrtillus</i>)			
Arándanos			
Grosellas [rojas, negras (<i>casís</i>) y blancas]			
Grosellas espinosas			
Otros			
e) Bayas y frutas silvestres		0,05 (*) (P)	
vi) OTRAS FRUTAS		0,05 (*) (P)	
Aguacates			
Plátanos			
Dátiles			
Higos			
Kiwis			
Kumquats			
Litchis			
Mangos			
Aceitunas (de mesa)			
Aceitunas (para producción de aceite)			
Papayas			
Frutas de la pasión			
Piñas			
Granadas			
Otros			
2. Hortalizas, frescas o sin cocer, congeladas o desecadas	0,05 (*) (P)		
i) RAÍCES Y TUBÉRCULOS			
Remolacha		0,1 (*) (P)	
Zanahorias			0,5
Yucas			
Apionabos			
Rábanos rusticanos			
Aguaturmas			
Chirivías			0,5
Perejil (raíz)			
Rábanos			0,5

Residuos de plaguicidas y contenidos máximos de residuos (mg/kg)			
Grupos y ejemplos de productos a los que se aplican los contenidos máximos de residuos	Desmedifam	Fenmedifam	clorfenvinfós (suma de isómeros E y Z)
Salsifíes			
Boniatos			
Colinabos			0,5
Nabos			0,5
Ñames			
Otros		0,05 (*) (P)	0,02 (*)
ii) BULBOS		0,05 (*) (P)	
Ajos			0,5
Cebollas			
Chalotes			0,5
Cebolletas			
Otros			0,02 (*)
iii) FRUTOS Y PEPÓNIDES		0,05 (*) (P)	
a) Solanáceas			0,02 (*)
Tomates			
Pimientos			
Berenjenas			
Quingombó			
Otros			
b) Cucurbitáceas, de piel comestible			
Pepinos			
Pepinillos			
Calabacines			0,1
Otros			0,02 (*)
c) Cucurbitáceas, de piel no comestible			0,02 (*)
Melones			
Calabazas			
Sandías			
Otros			
d) Maíz dulce			0,02 (*)
iv) HORTALIZAS DEL GÉNERO BRASSICA		0,05 (*) (P)	
a) Inflorescencias			0,02 (*)
Brécoles (incluido el Calabrese)			
Coliflores			
Otros			
b) Cogollos			
Coles de Bruselas			0,1
Repollos			0,5
Otros			0,02 (*)
c) Hojas			0,02 (*)

Residuos de plaguicidas y contenidos máximos de residuos (mg/kg)			
Grupos y ejemplos de productos a los que se aplican los contenidos máximos de residuos	Desmedifam	Fenmedifam	clorfenvinfós (suma de isómeros E y Z)
Coles de China			
Berzas			
Otros			
d) Colinabos			0,3
v) HORTALIZAS DE HOJA Y HIERBAS AROMÁTICAS FRESCAS			
a) Lechugas y similares		0,05 (*) (P)	
Berros			0,1
Canónigos (valeriana)			0,1
Lechugas			
Escarolas			
Ruccola			
Hojas y tallos de <i>Brassica</i>			
Otros			0,02 (*)
b) Espinacas y similares		0,5 (P)	
Espinacas			0,1
Acelgas			
Otros			0,02 (*)
c) Berros de agua		0,05 (*) (P)	0,02 (*)
d) Endivias		0,05 (*) (P)	0,02 (*)
e) Hierbas aromáticas		0,05 (*) (P)	
Perifollos			
Cebollinos			
Perejil			0,5
Hojas de apio			
Otros			0,02 (*)
vi) LEGUMINOSAS VERDES (FRESCAS)		0,05 (*) (P)	0,02 (*)
Judías (con vaina)			
Judías (sin vaina)			
Guisantes (con vaina)			
Guisantes (sin vaina)			
Otros			
vii) TALLOS JÓVENES			
Espárragos			0,1
Cardos comestibles			
Apio			0,5
Hinojos			
Alcachofas		0,2 (P)	
Puerros			0,1
Ruibarbo			
Otros		0,05 (*) (P)	0,02 (*)

Residuos de plaguicidas y contenidos máximos de residuos (mg/kg)			
Grupos y ejemplos de productos a los que se aplican los contenidos máximos de residuos	Desmedifam	Fenmedifam	clorfenvinfós (suma de isómeros E y Z)
viii) HONGOS Y SETAS		0,05 (*) (P)	
a) Champiñones			0,05
b) Setas silvestres			0,02 (*)
3. Legumbres	0,05 (*) (P)	0,05 (*) (P)	0,02 (*)
Judías			
Lentejas			
Guisantes			
Otros			
4. Oleaginosas	0,1 (*) (P)	0,1 (*) (P)	0,02 (*)
Semillas de lino			
Cacahuetes			
Semillas de adormidera			
Semillas de sésamo			
Semillas de girasol			
Semillas de colza			
Habas de soja			
Mostaza			
Semillas de algodón			
Semillas de cáñamo			
Otros			
5. Patatas	0,05 (*) (P)	0,05 (*) (P)	0,02 (*)
Patatas tempranas			
Patatas para almacenar			
6. Té (hojas y tallos desecados, fermentados o no, de <i>Camellia sinensis</i>)	0,1 (*) (P)	0,1 (*) (P)	0,05 (*)
7. Lúpulos (desecados), incluidos los granulados de lúpulo y el polvo no concentrado	0,1 (*) (P)	0,1 (*) (P)	0,05 (*)

(*) Indica el nivel más bajo de determinación analítica.

(P) Indica que el límite máximo ha sido establecido provisionalmente, de conformidad con el artículo 4, apartado 1, letra f), de la Directiva 91/414/CEE.»

DIRECTIVA 2006/63/CE DE LA COMISIÓN**de 14 de julio de 2006****por la que se modifican los anexos II a VII de la Directiva 98/57/CE del Consejo sobre el control de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.***

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Vista la Directiva 98/57/CE del Consejo, de 20 de julio de 1998, sobre el control de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* ⁽¹⁾, y, en particular, su artículo 11,

Considerando lo siguiente:

- (1) Uno de los organismos nocivos importantes que atacan a la patata y al tomate es *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, agente patógeno de la podredumbre parda de la patata y de la marchitez bacteriana de la planta de la patata y del tomate (denominada en lo sucesivo «el organismo»).
- (2) Este organismo todavía sigue existiendo en algunas partes de la Comunidad.
- (3) La Directiva 98/57/CE ha establecido las medidas detalladas que deben tomarse en los Estados miembros contra este organismo a fin de localizarlo y determinar su distribución, impedir su aparición y propagación y, en caso de que aparezca, evitar su propagación y controlarlo con vistas a su erradicación.
- (4) Desde entonces, se han producido importantes avances en la comprensión de la biología, la detección y los procedimientos de identificación del organismo; además, las experiencias prácticas obtenidas en el control del organismo hacen necesaria una revisión de las diferentes disposiciones técnicas relacionadas con medidas de control.
- (5) Como consecuencia de todo ello, se considera necesario revisar y actualizar las medidas incluidas en algunos anexos de la Directiva 98/57/CE.
- (6) Por lo que se refiere a los procedimientos de detección e identificación, se incorpora un método moderno de detección, la hibridación fluorescente *in situ* (FISH). También se han incluido mejoras en el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), así como en diferentes

elementos técnicos del actual procedimiento de detección e identificación, y métodos para la detección y la identificación del organismo en plantas huésped diferentes de la patata, así como en el agua y el suelo.

- (7) Por lo que respecta a los elementos técnicos de las medidas de control, se prevén disposiciones mejoradas para la manera de conservar las muestras sometidas a prueba a fin de garantizar la trazabilidad del organismo, los elementos necesarios para determinar el alcance de la contaminación probable, los detalles de la notificación de toda presencia confirmada del organismo y de la zona contaminada pertinente y las medidas que deben aplicarse en los lugares de producción declarados contaminados y dentro de las zonas delimitadas. Además, se han incorporado algunas disposiciones sobre los tomates a fin de tener mejor en cuenta la importancia de esta planta como huésped para el organismo.
- (8) Las medidas previstas en la presente Directiva se ajustan al dictamen del Comité fitosanitario permanente.

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Artículo 1

Los anexos II a VII de la Directiva 98/57/CE quedan sustituidos por los textos correspondientes en el anexo de la presente Directiva.

Artículo 2

1. Los Estados miembros adoptarán y publicarán las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas necesarias para cumplir la presente Directiva a más tardar el 31 de marzo de 2007. Comunicarán inmediatamente a la Comisión el texto de estas disposiciones y un cuadro de correspondencias entre estas disposiciones y la Directiva.

Aplicarán dichas disposiciones a partir del 1 de abril de 2007.

Cuando los Estados miembros adopten dichas disposiciones, estas incluirán una referencia a la presente Directiva o irán acompañadas de dicha referencia en su publicación oficial. Los Estados miembros establecerán las modalidades de la mencionada referencia.

⁽¹⁾ DO L 235 de 21.8.1998, p. 1.

2. Los Estados miembros comunicarán inmediatamente a la Comisión el texto de las principales disposiciones de Derecho interno que adopten en el ámbito regulado por la presente Directiva.

Artículo 3

La presente Directiva entrará en vigor el tercer día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

Artículo 4

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 14 de julio de 2006.

Por la Comisión
Markos KYPRIANOU
Miembro de la Comisión

ANEXO

«ANEXO II

MÉTODO DE DIAGNÓSTICO, DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *RALSTONIA SOLANACEARUM* (SMITH) YABUUCHI ET AL.

ÁMBITO DE APLICACIÓN DEL MÉTODO

El presente método describe los diversos procedimientos relacionados con:

- i) el diagnóstico de la podredumbre parda en los tubérculos de patata y de la marchitez bacteriana en las plantas de patata, tomate y otras plantas huésped,
- ii) la detección de *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*) en muestras de tubérculos de patata, plantas de patata, tomate y otras plantas huésped, agua y suelo,
- iii) la identificación de *R. solanacearum*.

ÍNDICE

	Página
Principios generales	40
SECCIÓN I: Aplicación del método	40
1. Método de detección para el diagnóstico de la podredumbre parda y la marchitez bacteriana (<i>R. solanacearum</i>) en tubérculos de patata y plantas de patata, tomate u otras plantas huésped con síntomas de la podredumbre parda o la marchitez bacteriana	40
2. Método de detección e identificación de <i>R. solanacearum</i> en muestras asintomáticas de tubérculos de patata	43
3. Método de detección e identificación de <i>R. solanacearum</i> en muestras asintomáticas de patatas, tomates y otras plantas huésped	46
SECCIÓN II: Métodos detallados de detección de <i>R. solanacearum</i> en tubérculos de patata y plantas de patata, tomate u otras plantas huésped con síntomas de la podredumbre parda o la marchitez bacteriana .	48
1. Síntomas	48
2. Pruebas de selección rápida	48
3. Proceso de aislamiento	49
4. Pruebas de identificación de <i>R. solanacearum</i>	49
SECCIÓN III: 1. Métodos detallados de detección e identificación de <i>R. solanacearum</i> en muestras asintomáticas de tubérculos de patata	49
1.1. Preparación de la muestra	49
1.2. Análisis	51
2. Métodos detallados de detección e identificación de <i>R. solanacearum</i> en muestras asintomáticas de patatas, tomates y otras plantas huésped	51
2.1. Preparación de la muestra	51
2.2. Análisis	52
SECCIÓN IV: 1. Esquema del método de detección e identificación de <i>R. solanacearum</i> en el agua	53
2. Métodos de detección e identificación de <i>R. solanacearum</i> en el agua	55
2.1. Preparación de la muestra	55
2.2. Análisis	55
SECCIÓN V: 1. Esquema del método de detección e identificación de <i>R. solanacearum</i> en el suelo	56
2. Métodos de detección e identificación de <i>R. solanacearum</i> en el suelo	58
2.1. Preparación de la muestra	58
2.2. Análisis	58

	Página
SECCIÓN VI: Protocolos optimizados para la detección e identificación de <i>R. solanacearum</i>	58
A. Pruebas de diagnóstico y detección	58
1. Prueba de la exudación del tallo	58
2. Prueba de la detección de gránulos de poli-β-hidroxibutirato	58
3. Pruebas de aglutinación serológica	59
4. Aislamiento selectivo	60
4.1. Siembra en medio selectivo	60
4.2. Procedimiento de enriquecimiento	60
5. Prueba de inmunofluorescencia (prueba IF)	61
6. Prueba de reacción en cadena de la polimerasa (prueba PCR)	64
6.1. Métodos de purificación del ADN	65
a) Método de Pstrik (2000)	65
b) Otros métodos	65
6.2. PCR	66
6.3. Análisis del producto de la PCR	66
7. Prueba de hibridación fluorescente <i>in situ</i> (prueba FISH)	67
8. Pruebas de ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA)	69
a) ELISA indirecta	69
b) DASI (doble sandwich de anticuerpos indirecto) ELISA	70
9. Prueba de bioensayo	71
B. Pruebas de identificación	72
1. Pruebas de identificación nutricional y enzimática	72
2. Prueba IF	72
3. Prueba ELISA	73
4. Prueba PCR	73
5. Prueba FISH	73
6. Perfiles de ácidos grasos (<i>Fatty acid profiling</i> o FAP)	73
7. Métodos de caracterización de las cepas	73
7.1. Determinación de los biovares	73
7.2. Obtención de la huella dactilar genómica	74
7.3. Métodos PCR	74
C. Prueba de confirmación	74
Apéndice 1 Laboratorios que han participado en la optimización y la validación de los protocolos	76
Apéndice 2 Medios para el aislamiento y el cultivo de <i>R. solanacearum</i>	77
Apéndice 3 A. Material de control normalizado comercialmente disponible	79
B. Preparación de controles positivos y negativos	80
Apéndice 4 Tampones para procedimientos de ensayo	82
Apéndice 5 Determinación del nivel de contaminación en las pruebas IF y FISH	85
Apéndice 6 Protocolos y reactivos PCR validados	86
Apéndice 7 Reactivos validados para la prueba FISH	91
Apéndice 8 Condiciones de cultivo para el tomate y la berenjena	93
Referencias	94

PRINCIPIOS GENERALES

En los apéndices se presentan protocolos optimizados para los diferentes métodos y reactivos validados, así como información detallada para la preparación de materiales de prueba y control. En el apéndice 1 se presenta una lista de los laboratorios que se incluyeron en la optimización y validación de los protocolos.

Habida cuenta de que los protocolos implican la detección de un organismo de cuarentena y de que incluirán la utilización de cultivos viables de *R. solanacearum* como materiales de control, será preciso llevar a cabo los procedimientos bajo condiciones de cuarentena apropiadas, con instalaciones adecuadas de eliminación de residuos y en aplicación de las condiciones de obtención de los permisos apropiados emitidos por las autoridades oficiales de cuarentena de las plantas.

Los parámetros de las pruebas deben garantizar una detección coherente y reproducible de niveles de *R. solanacearum* en los límites establecidos en los métodos seleccionados.

Es imprescindible una preparación precisa de los controles positivos.

Asimismo, la realización de pruebas con arreglo a los niveles requeridos implica la utilización de los parámetros correctos, el mantenimiento y el calibrado del equipo, una preservación y manipulación cuidadosa de los reactivos y todas las medidas para evitar la contaminación entre las muestras, como por ejemplo la separación de los controles positivos de las muestras de ensayo. Deben aplicarse normas de control de la calidad para evitar errores administrativos y de otro tipo, especialmente de etiquetado y documentación.

Una sospecha de brote, tal como se menciona en el artículo 4, apartado 2, de la Directiva 98/57/CE, implica la obtención de un resultado positivo de las pruebas de diagnóstico o selección efectuadas a una muestra tal como se especifica en los siguientes diagramas de flujo. Un resultado positivo en la primera prueba de selección (prueba IF, PCR/FISH, aislamiento selectivo) debe confirmarse con una segunda prueba de selección basada en un principio biológico diferente.

Si la primera prueba de selección arroja un resultado positivo, se sospecha entonces la contaminación con *R. solanacearum* y debe efectuarse una segunda prueba de selección. Si la segunda prueba de selección arroja un resultado positivo, se confirma entonces la sospecha (sospecha de presencia) y debe continuar la prueba con arreglo al método. Si la segunda prueba de selección arroja un resultado negativo, se considera entonces que la muestra no está contaminada con *R. solanacearum*.

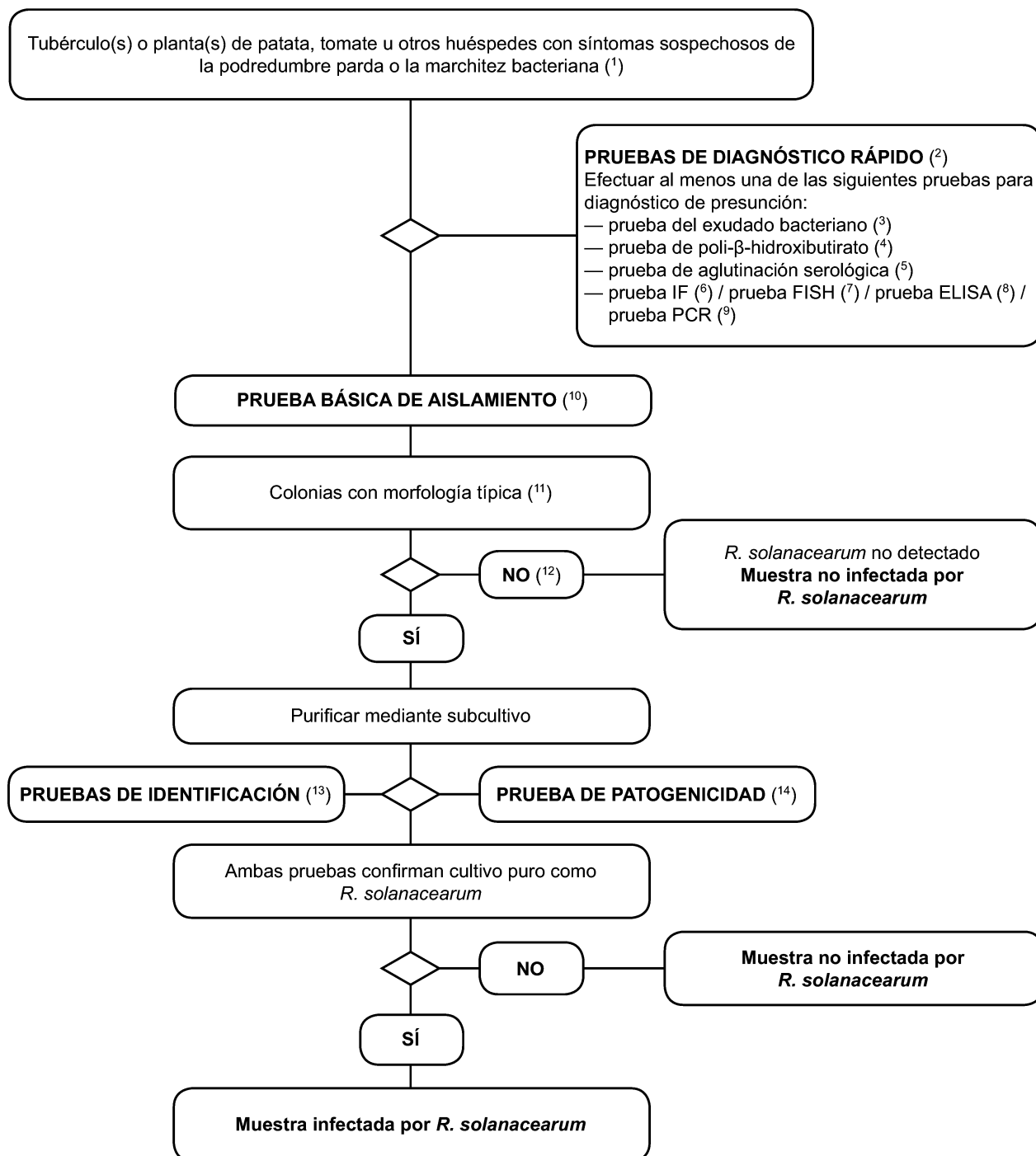
Una presencia confirmada, tal como se menciona en el artículo 5, apartado 1, de la Directiva 98/57/CE, implica el aislamiento y la identificación de un cultivo puro de *R. solanacearum* con confirmación de patogenicidad.

SECCIÓN I

APLICACIÓN DEL MÉTODO

1. Método de detección para el diagnóstico de la podredumbre parda y la marchitez bacteriana (*R. solanacearum*) en tubérculos de patata y plantas de patata, tomate u otras plantas huésped con síntomas de la podredumbre parda o la marchitez bacteriana

El procedimiento de análisis está destinado a los tubérculos de patata y a las plantas que presentan síntomas típicos de la podredumbre parda o la marchitez vascular o que permiten la sospecha de su presencia. Incluye una prueba de selección rápida, el aislamiento del patógeno del tejido vascular infectado en un medio (selectivo) y, en caso de resultado positivo, la identificación del cultivo como *R. solanacearum*.



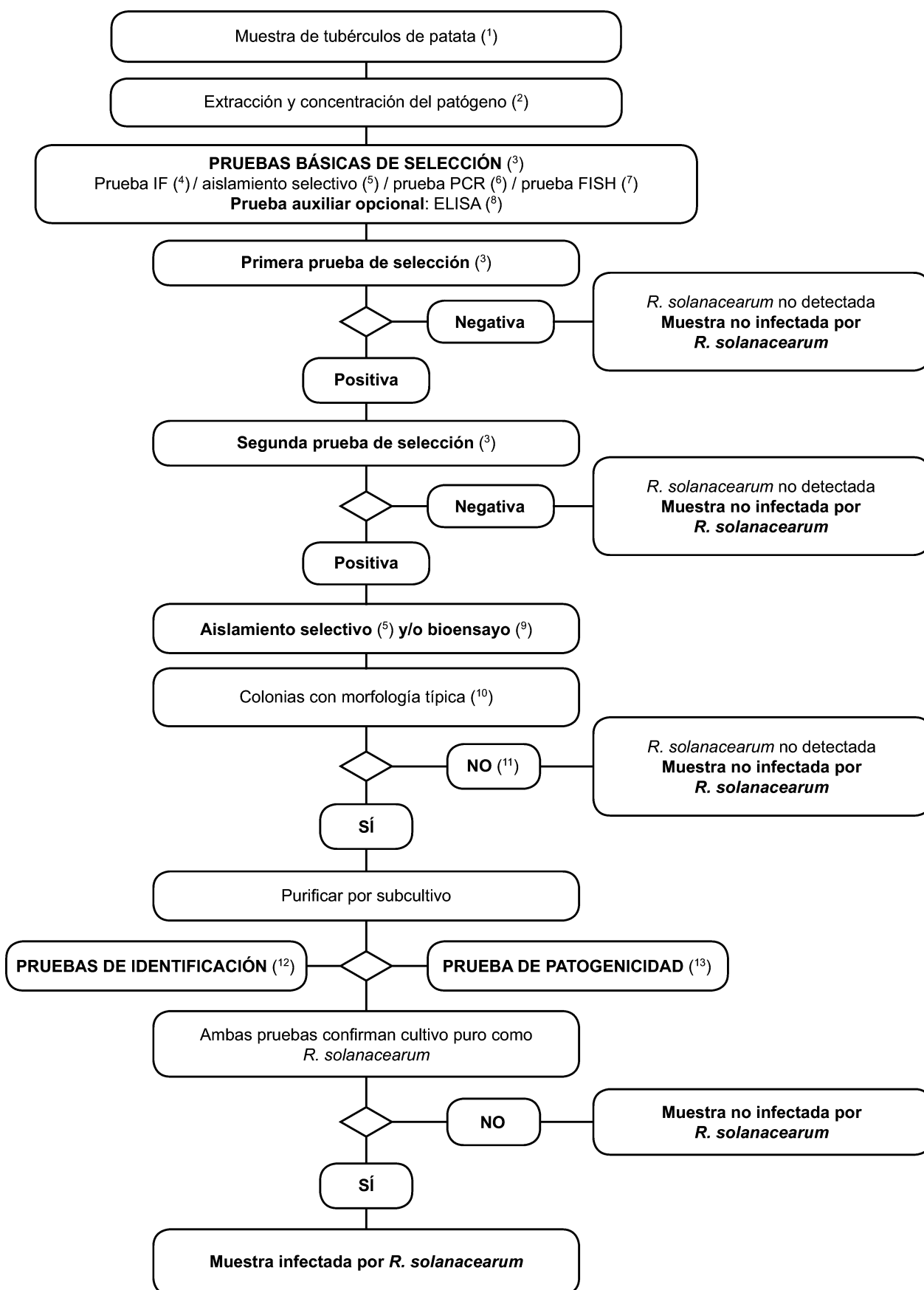
- (¹) Para la descripción de los síntomas véase la sección II.1.
- (²) Las pruebas de diagnóstico rápido facilitan el diagnóstico de presunción, pero no son esenciales. Un resultado negativo no garantiza en todos los casos la inexistencia del patógeno.
- (³) En la sección VI.A.1 se describe la prueba de la exudación para el líquido bacteriano del tejido vascular del tallo.
- (⁴) En la sección VI.A.2 se describe la prueba de detección de gránulos de poli- β -hidroxibutirato en células bacterianas.
- (⁵) En la sección VI.A.3 se describen las pruebas de aglutinación serológica en líquido bacteriano o extractos de tejido sintomático.
- (⁶) En la sección VI.A.5 se describe la prueba IF en líquido bacteriano suspendido en agua o extractos de tejido sintomático.
- (⁷) En la sección VI.A.7 se describe la prueba FISH en líquido bacteriano suspendido en agua o extractos de tejido sintomático.
- (⁸) En la sección VI.A.8 se describe la prueba ELISA en líquido bacteriano suspendido en agua o extractos de tejido sintomático.
- (⁹) En la sección VI.A.6 se describe la prueba PCR en líquido bacteriano suspendido en agua o extractos de tejido sintomático.
- (¹⁰) El patógeno suele aislarse con facilidad del material vegetal sintomático mediante dilución en placas (sección II.3).
- (¹¹) La morfología típica de la colonia se describe en la sección II.3.d.
- (¹²) El cultivo puede fallar en estados avanzados de infección debido a la competencia o el enmascaramiento por bacterias saprofitas. Si los síntomas de la enfermedad son los típicos, pero el aislamiento es negativo, deberá repetirse el aislamiento, preferentemente valiéndose de una siembra en medio selectivo.
- (¹³) La identificación fiable de cultivos puros presuntamente de aislados de *R. solanacearum* se efectúa utilizando las pruebas descritas en la sección VI.B. La caracterización subespecífica de las cepas es optativa, pero se recomienda en cada caso nuevo.
- (¹⁴) La prueba de patogenicidad se describe en la sección VI.C.

2. Método de detección e identificación de *R. solanacearum* en muestras asintomáticas de tubérculos de patata

Fundamento

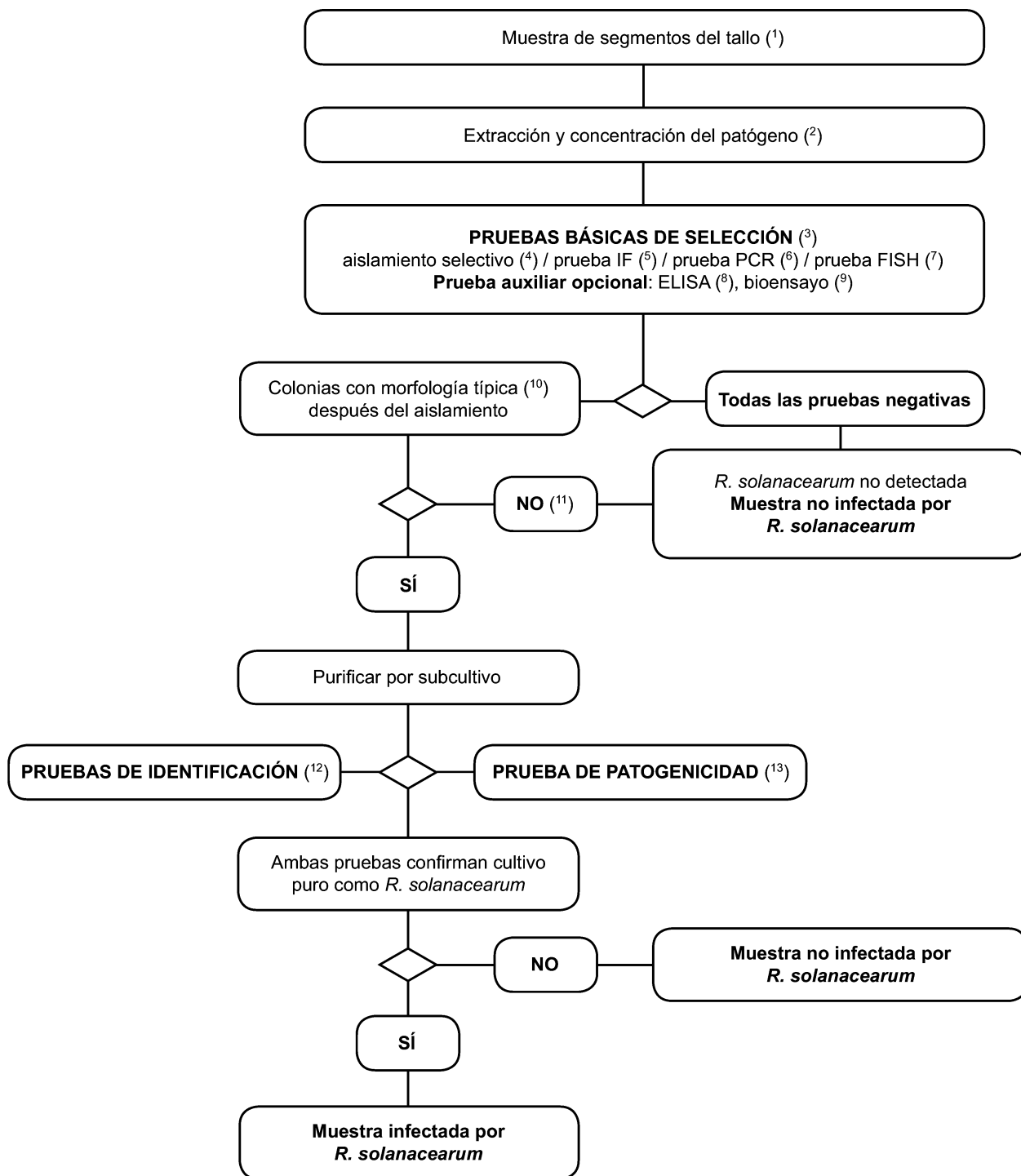
El procedimiento de análisis tiene por objeto la detección de infecciones latentes en tubérculos de patata. Un resultado positivo de un mínimo de dos pruebas de selección³, basadas en diferentes principios biológicos, debe complementarse con el aislamiento del patógeno, seguido, en caso de aislamiento de colonias típicas, por la confirmación de un cultivo puro como *R. solanacearum*. Un resultado positivo de solamente una de las pruebas de selección no es suficiente para considerar sospechosa la muestra.

Las pruebas de selección y las pruebas de aislamiento deben permitir la detección de 10^3 a 10^4 células/ml de precipitado resuspendido, incluidas como controles positivos en cada serie de pruebas.



- (¹) El tamaño normal de la muestra es de 200 tubérculos, aunque el procedimiento puede utilizarse con muestras más pequeñas si no se dispone de 200 tubérculos.
- (²) En la sección III.1.1 se describen los métodos de extracción y concentración de patógenos.
- (³) Si un mínimo de dos pruebas basadas en diferentes principios biológicos dan resultados positivos, debe efectuarse el aislamiento y la confirmación. Efectúese como mínimo una prueba de selección. Cuando esta prueba dé resultados negativos, se considerará que la muestra es negativa. En caso de que la prueba dé resultados positivos, deberá efectuarse una segunda prueba de selección, o varias más, basadas en diferentes principios biológicos, con el fin de verificar el primer resultado positivo. Si la segunda prueba o las pruebas siguientes dan resultados negativos, la muestra se considerará negativa. No será preciso efectuar otras pruebas.
- (⁴) En la sección VI.A.5 se describe la prueba IF.
- (⁵) En la sección VI.A.4 se describe la prueba de aislamiento selectivo.
- (⁶) En la sección VI.A.6 se describen las pruebas PCR.
- (⁷) En la sección VI.A.7 se describe la prueba FISH.
- (⁸) En la sección VI.A.8 se describen las pruebas ELISA.
- (⁹) En la sección VI.A.9 se describe la prueba del bioensayo.
- (¹⁰) La morfología típica de la colonia se describe en la sección II.3.d.
- (¹¹) El cultivo o los bioensayos pueden fallar debido a la competencia o la inhibición por bacterias saprofitas. Si se obtienen resultados positivos claros en las pruebas de selección, pero las pruebas de aislamiento dan resultados negativos, entonces deben repetirse las pruebas de aislamiento a partir del mismo precipitado o tomando más tejido vascular cerca de la parte basal de tubérculos cortados de la misma muestra y, en caso necesario, analizar otras muestras.
- (¹²) La identificación fiable de cultivos puros presuntamente de aislados de *R. solanacearum* se efectúa utilizando las pruebas descritas en la sección VI.B.
- (¹³) La prueba de patogenicidad se describe en la sección VI.C.

3. Método de detección e identificación de *R. solanacearum* en muestras asintomáticas de patatas, tomates y otras plantas huésped



- (¹) Véase la sección III.2.1 para los tamaños recomendados de las muestras.
- (²) En la sección III.2.1 se describen los métodos de extracción y concentración de patógenos.
- (³) Si un mínimo de dos pruebas basadas en diferentes principios biológicos dan resultados positivos, debe efectuarse el aislamiento y la confirmación. Efectúese como mínimo una prueba de selección. Cuando esta prueba dé resultados negativos, se considerará que la muestra es negativa. En caso de que la prueba dé resultados positivos, deberá efectuarse una segunda prueba de selección, o varias más, basadas en diferentes principios biológicos, con el fin de verificar el primer resultado positivo. Si la segunda prueba o las pruebas siguientes dan resultados negativos, la muestra se considerará negativa. No será preciso efectuar otras pruebas.
- (⁴) En la sección VI.A.4 se describe la prueba de aislamiento selectivo.
- (⁵) En la sección VI.A.5 se describe la prueba IF.
- (⁶) En la sección VI.A.6 se describen las pruebas PCR.
- (⁷) En la sección VI.A.7 se describe la prueba FISH.
- (⁸) En la sección VI.A.8 se describen las pruebas ELISA.
- (⁹) En la sección VI.A.9 se describe la prueba del bioensayo.
- (¹⁰) La morfología típica de la colonia se describe en la sección II.3.d.
- (¹¹) El cultivo o los bioensayos pueden fallar debido a la competencia o la inhibición por bacterias saprofitas. Si se obtienen resultados positivos en las pruebas de selección, pero las pruebas de aislamiento dan resultados negativos, entonces deben repetirse las pruebas de aislamiento.
- (¹²) La identificación fiable de cultivos puros presuntamente de aislados de *R. solanacearum* se efectúa utilizando las pruebas descritas en la sección VI.B.
- (¹³) La prueba de patogenicidad se describe en la sección VI.C.

SECCIÓN II

MÉTODOS DETALLADOS DE DETECCIÓN DE *R. SOLANACEARUM* EN TUBÉRCULOS DE PATATA Y PLANTAS DE PATATA, TOMATE U OTRAS PLANTAS HUÉSPED CON SÍNTOMAS DE LA PODREDUMBRE PARDA O LA MARCHITEZ BACTERIANA

1. **Síntomas** (véase el sitio web: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>)

1.1. Síntomas en las patatas

La planta de la patata. La fase inicial de la infección en el campo se reconoce por un marchitamiento de las hojas en progresión ascendente hacia el extremo superior de la planta, bajo el efecto de las temperaturas diurnas altas, con una recuperación durante la noche. En las primeras fases del marchitamiento, las hojas siguen estando verdes, pero posteriormente se desarrolla necrosis parda y amarilleo. También se produce epinastia. El marchitamiento de un brote o de plantas enteras se hace rápidamente irreversible y ocasiona el colapso y la muerte de la planta. El tejido vascular de los tallos de las plantas marchitadas cortados transversalmente suele ser pardo, y de la superficie del corte brota un exudado mucoso bacteriano o este puede extraerse apretando el tallo. Si se coloca verticalmente un tallo cortado en agua, de los haces vasculares salen hilos viscosos.

El tubérculo de la patata. Los tubérculos de patata deben cortarse transversalmente cerca de la parte basal (estolón) o bien longitudinalmente sobre el estolón. La fase inicial de la infección en el campo se reconoce por un marchitamiento de las hojas en progresión ascendente hacia el extremo superior de la planta, bajo el efecto de las temperaturas diurnas altas, con una recuperación durante la noche. Posteriormente, la decoloración vascular adquiere un tono pardo más marcado y la necrosis puede extenderse al tejido parenquimático. En las fases avanzadas, la infección progresa desde la parte basal y los ojos, por las que pueden fluir hilos de flujo bacteriano, lo que hace que se adhieran partículas del suelo. Pueden aparecer en la piel lesiones ligeramente hundidas de color pardo rojizo debido al colapso interno de los tejidos vasculares. En las fases avanzadas de la enfermedad es habitual el desarrollo secundario de podredumbre blanda causada por hongos y bacterias.

1.2. Síntomas en los tomates

La planta del tomate. El primer síntoma visible es el aspecto flácido de las hojas más jóvenes. Si se producen condiciones medioambientales favorables para el patógeno (temperaturas del suelo de 25 °C; humedad saturada), en un plazo de pocos días se produce epinastia y marchitamiento de un lado de la planta o de toda ella, lo que desemboca en un colapso total de la planta. En condiciones menos favorables (temperatura del suelo por debajo de 21 °C), se produce un menor marchitamiento, pero pueden surgir numerosas raíces adventicias del tallo. En ocasiones se observan estrías empapadas de agua desde la base del tallo, lo que demuestra la existencia de necrosis en el sistema vascular. Al cortar transversalmente el tallo, los tejidos vasculares que presentan una decoloración parda exudan gotas de líquido bacteriano blanco o amarillento.

1.3. Síntomas en otros huéspedes

Plantas de Solanum dulcamara y S. nigrum. En condiciones naturales, en pocos casos se observan síntomas de marchitamiento en estos huéspedes herbáceos a no ser que las temperaturas del suelo superen los 25 °C o los niveles de inóculo sean extremadamente elevados (por ejemplo, para *S. nigrum* que crezca junto a plantas enfermas de patatas o tomates). Cuando se produce el marchitamiento, los síntomas son como los descritos para el tomate. Las plantas de *S. dulcamara*, que no se marchitan y que crecen con tallos y raíces en el agua, pueden mostrar una decoloración interna pardo claro de los tejidos vasculares en una sección transversal de la base del tallo o las partes del tallo que se encuentran bajo el agua. Pueden fluir bacterias de los tejidos vasculares cortados, o formar hilos viscosos, si el tallo cortado se coloca verticalmente en el agua, incluido en caso de inexistencia de síntomas de marchitamiento.

2. **Pruebas de selección rápida**

Las pruebas de selección rápida facilitan el diagnóstico de presunción, pero no son esenciales. Realícese una o más de las siguientes pruebas validadas:

2.1. Prueba de la exudación del tallo

(Véase la sección VI.A.1.)

2.2. Prueba de la detección de gránulos de poli-β-hidroxibutirato (PHB)

Los gránulos de PHB característicos en las células de *R. solanacearum* se visualizan tiñendo frotis de exudado bacteriano fijado con calor procedente de tejido infectado en un portaobjetos con azul Nilo A o negro Sudán B (véase la sección VI.A.2).

2.3. Pruebas de aglutinación serológica

(Véase la sección VI.A.3.)

2.4. Otras pruebas

Otras pruebas de selección rápida apropiadas incluyen la prueba IF (véase la sección VI.A.5), la prueba FISH (véase la sección VI.A.7), las pruebas ELISA (véase la sección VI.A.8) y las pruebas PCR (véase la sección VI.A.6).

3. Proceso de aislamiento

- a) Coger exudado o secciones de tejido decolorado del anillo vascular del tubérculo o de los haces vasculares del tallo de la planta de patata, de tomate o de otras plantas huésped en proceso de marchitamiento. Poner en suspensión en un volumen reducido de agua destilada estéril o en tampón fosfato 50 mM (apéndice 4) y dejar entre cinco y diez minutos.
- b) Preparar una serie de diluciones decimales de la suspensión.
- c) Echar 50-100 µl de la suspensión y las diluciones en un medio nutritivo general (NA, YPGA o SPA; véase el apéndice 2) y/o en un medio de tetrazolio de Kelman (apéndice 2) y/o un medio selectivo validado (por ejemplo, SMSA; véase el apéndice 2). Extender o hacer estrías con una técnica adecuada de dilución en placas. Si se considera útil, preparar un conjunto de placas distintas con un cultivo de una suspensión celular diluida de *R. solanacearum* biovar 2 como control positivo.
- d) Incubar las placas entre dos y seis días a 28 °C.
 - En un medio nutritivo general, los aislados virulentos de *R. solanacearum* desarrollan colonias de color blanco nacarado, planas, irregulares y fluidas, que con frecuencia presentan los verticilos característicos en el centro. Las formas avirulentas de *R. solanacearum* forman colonias butirosas pequeñas, redondas y no fluidas, que son completamente blancas.
 - En los medios de tetrazolio de Kelman y SMSA, los verticilos son de color rojo sangre. Las formas avirulentas de *R. solanacearum* forman colonias butirosas pequeñas, redondas y no fluidas, que son totalmente de color rojo oscuro.

4. Pruebas de identificación de *R. solanacearum*

Las pruebas para confirmar la identidad de presuntos aislados de *R. solanacearum* se muestran en la sección VI.B.

SECCIÓN III

1. Métodos detallados de detección e identificación de *R. solanacearum* en muestras asintomáticas de tubérculos de patata

1.1. Preparación de la muestra

Nota:

- El tamaño normal de la muestra es de 200 tubérculos. Un muestreo más intensivo requiere más pruebas en muestras de este tamaño. Un mayor número de tubérculos en la muestra producirá inhibición o una interpretación difícil de los resultados. Sin embargo, el procedimiento puede aplicarse convenientemente a muestras de menos de 200 tubérculos, cuando se disponga de pocos tubérculos.
- La validación de todos los métodos de detección descritos a continuación se basa en la realización de pruebas a muestras de 200 tubérculos.
- El extracto de patata descrito a continuación puede utilizarse también para la detección de la bacteria de la necrosis bacteriana de la patata, *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus*.

Pretratamiento opcional previo a la preparación de la muestra:

- a) incubación de muestras a 25-30 °C, hasta un máximo de dos semanas antes de la realización de la prueba, con el fin de alentar la multiplicación de cualquier población de *R. solanacearum*;
- b) lavar los tubérculos. Utilizar desinfectantes apropiados (compuestos de cloro cuando vaya a utilizarse la prueba PCR a fin de eliminar el ADN patógeno) y detergentes entre cada muestra. Secar al aire los tubérculos. Este procedimiento de lavado es especialmente útil (pero no obligatorio) para las muestras con exceso de tierra y si debe realizarse una prueba PCR o un procedimiento de aislamiento directo.

- 1.1.1. Quitar la epidermis de la parte basal (estolón) del tubérculo con un bisturí o un cuchillo limpio y desinfectado, de modo que los tejidos vasculares queden a la vista. Extraer con cuidado una cuña cónica pequeña de tejido vascular de la parte basal y extraer el mínimo volumen posible de tejido no vascular (véase el sitio web: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Nota: Retirar los tubérculos (podridos) que presenten síntomas sospechosos de "podredumbre parda" y analizarlos por separado.

Si durante la extracción de la cuña de la parte basal se observan síntomas sospechosos de la podredumbre parda, deberá efectuarse una inspección visual del tubérculo, y cortarse este cerca de la parte basal. Todo tubérculo cortado con síntomas sospechosos deberá guardarse durante un mínimo de dos días a temperatura ambiente a fin de permitir la suberización y almacenar refrigerado (a 4-10 °C) en condiciones de cuarentena apropiadas. Todos los tubérculos, incluidos los que presenten síntomas sospechosos, deberán mantenerse con arreglo a lo establecido en el anexo III.

- 1.1.2. Colocar las cuñas de la parte basal en recipientes desechables no utilizados que puedan cerrarse y/o sellarse (en caso de reutilización de los recipientes, deberán limpiarse y desinfectarse por completo utilizando compuestos de cloro). Es conveniente procesar las cuñas inmediatamente. Si esto no es posible, almacenarlas en el recipiente, sin añadir ningún tampón, refrigeradas durante un período máximo de 72 horas o de 24 horas a temperatura ambiente.

Procesar las cuñas por uno de los métodos siguientes:

- a) bien cubrir las cuñas con un volumen suficiente (aproximadamente 40 ml) de tampón de extracción (apéndice 4) y agitar en un agitador rotatorio (50-100 rpm) durante cuatro horas por debajo de 24 °C o refrigeradas entre 16 y 24 horas,

o bien

- b) homogeneizar las cuñas con un volumen suficiente (aproximadamente 40 ml) de tampón de extracción (apéndice 4) en una trituradora (por ejemplo, Waring o Ultra Thurax) o machacándolas en una bolsa de maceración desechable sellada (por ejemplo, Stomacher o Bioreba de polietileno de gran calibre, 150 mm × 250 mm; esterilizada por radiación) utilizando un mazo de goma o un aparato de trituración adecuado (por ejemplo, Homex).

Nota: Existe un elevado riesgo de contaminación cruzada de muestras cuando se homogeneizan las muestras utilizando una trituradora. Tomar precauciones a fin de evitar la generación de aerosoles o el vertido durante el proceso de extracción. Debe asegurarse que se utilizan para cada muestra recipientes y cuchillas de trituradora esterilizados. Si se utiliza la prueba PCR, evitar la transferencia de ADN en los recipientes o el aparato de trituración. Al utilizar PCR, se recomienda machacar el material en bolsas desechables y utilizar tubos desechables.

- 1.1.3. Se desecha el sobrenadante. Si es demasiado turbio, clarificarlo con una centrifugación a baja velocidad (no más de 180 g durante diez minutos a una temperatura entre 4-10 °C) o mediante filtración al vacío (40-100 µm), lavando el filtro con tampón de extracción adicional (10 ml).

- 1.1.4. Concentrar la fracción bacteriana por centrifugación a 7 000 g durante 15 minutos (o 10 000 g durante diez minutos) a una temperatura entre 4-10 °C y descartar el sobrenadante sin perturbar el sedimento.

- 1.1.5. Resuspender el precipitado en 1,5 ml de tampón de precipitado (apéndice 4). Utilizar 500 µl para pruebas de *R. solanacearum*, 500 µl para *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* y 500 µl para referencia. Añadir glicerol estéril a la concentración final de 10-25 % (v/v) a los 500 µl de la alícuota de referencia y a la restante alícuota de prueba, mezclar y almacenar a una temperatura comprendida entre -16 a -24 °C (semanas) o entre -68 a -86 °C (meses). Mantener las alícuotas de prueba a entre 4-10 °C durante la prueba.

No se aconseja congelar y descongelar repetidamente.

Si debe transportarse el extracto, entréguese en un recipiente frío en un plazo de 24 a 48 horas.

- 1.1.6. Es de capital importancia tratar por separado todos los controles y muestras positivos de *R. solanacearum* para evitar la contaminación. Esto se aplica a los portaobjetos IF y a todas las pruebas.

1.2. Análisis

Véase el diagrama de flujo y la descripción de las pruebas y los protocolos optimizados en los apéndices pertinentes:

Aislamiento selectivo (véase la sección VI.A.4)

Prueba IF (véase la sección VI.A.5)

Pruebas PCR (véase la sección VI.A.6)

Prueba FISH (véase la sección VI.A.7)

Pruebas ELISA (véase la sección VI.A.8)

Bioensayo (véase la sección VI.A.9)

2. Métodos detallados de detección e identificación de *R. solanacearum* en muestras asintomáticas de patatas, tomates y otras plantas huésped

2.1. Preparación de la muestra

Nota: Para la detección de poblaciones latentes de *R. solanacearum* se aconseja someter a prueba muestras mixtas. El procedimiento puede aplicarse convenientemente a muestras mixtas de hasta 200 partes del tallo. Cuando se efectúen exámenes, deberán basarse en una muestra estadísticamente representativa de la población de plantas investigada.

2.1.1. Colocar segmentos de tallo de 1-2 cm en un recipiente estéril cerrado con arreglo a los siguientes procedimientos de muestreo:

Plántulas de tomate de vivero: con un cuchillo limpio y desinfectado, cortar un segmento de 1 cm de la base de cada tallo, justo por encima del nivel del suelo.

Plantas de tomate cultivadas en el campo o en un invernadero: con un cuchillo limpio y desinfectado, arrancar el brote lateral más inferior de cada planta cortando justo por encima de la unión con el tallo principal. Cortar un segmento de 1 cm del extremo inferior de cada brote lateral.

Otros huéspedes: con un cuchillo limpio y desinfectado o con tijeras de podar, cortar un segmento de 1 cm de la base de cada tallo, justo por encima del nivel del suelo. En el caso de *S. dulcamara* o de otras plantas huésped que crecen en el agua, cortar secciones de 1-2 cm de los tallos bajo el agua o estolones con raíces acuáticas.

Cuando se muestree un lugar específico, se recomienda analizar una muestra estadísticamente representativa de un mínimo de diez plantas por punto de muestreo de cada huésped herbáceo potencial. La detección del patógeno será más fiable a finales de primavera, en verano y en otoño, aunque las infecciones naturales pueden detectarse durante todo el año en *Solanum dulcamara* perenne que crece en cursos de agua. Los huéspedes conocidos incluyen plantas de patata espontáneas (*groundkeepers*), *Solanum dulcamara*, *S. nigrum*, *Datura stramonium* y otros miembros de la familia Solanaceae. Otros huéspedes son *Pelargonium* spp. y *Portulaca oleracea*. Entre las especies herbáceas europeas que pueden albergar potencialmente poblaciones de *R. solanacearum* biovar 2/raza 3 en raíces y/o rizosferas, en condiciones medioambientales específicas, se incluyen: *Atriplex hastata*, *Bidens pilosa*, *Cerastium glomeratum*, *Chenopodium album*, *Eupatorium cannabinum*, *Galinsoga parviflora*, *Ranunculus scleratus*, *Rorippa* spp, *Rumex* spp, *Silene alba*, *S. nutans*, *Tussilago farfara* y *Urtica dioica*.

Nota: Puede efectuarse en este momento el examen visual para detectar síntomas internos (coloración vascular o líquido bacteriano). Retirar todos los segmentos del tallo con síntomas y analizarlos por separado (véase la sección II).

2.1.2. Desinfectar brevemente los segmentos del tallo con etanol al 70 % y secar inmediatamente con un pañuelo de papel. A continuación, procesar los segmentos del tallo mediante uno de los procedimientos siguientes:

- cubrir los segmentos con un volumen suficiente (aproximadamente 40 ml) de tampón de extracción (apéndice 4) y agitar en un agitador rotatorio (50-100 rpm) durante cuatro horas por debajo de 24 °C o refrigerados entre 16 y 24 horas, o bien
- procesar inmediatamente machacando los segmentos en una bolsa de maceración resistente (por ejemplo, Stomacher o Bioreba) con un volumen apropiado de tampón de extracción (apéndice 4) utilizando un mazo de goma o un aparato de trituración adecuado (por ejemplo, Homex). De no ser posible, almacenar los segmentos del tallo refrigerados durante un máximo de 72 horas o un máximo de 24 horas a temperatura ambiente.

2.1.3. Desechar el sobrenadante tras 15 minutos de sedimentación.

2.1.4. No suele ser necesaria otra clarificación del extracto o la concentración de la fracción bacteriana, pero puede conseguirse por filtración y/o centrifugación tal como se describe en la sección III.1.1.3 a 1.1.5.

- 2.1.5. Dividir el extracto de la muestra pura o concentrada en dos partes iguales. Mantener una mitad entre 4 y 10 °C durante el análisis y almacenar la otra mitad con glicerol estéril al 10-25 % (v/v) entre – 16 y – 24 °C (semanas) o entre – 68 y – 86 °C (mes) en caso de que deban efectuarse nuevas pruebas.

2.2. Análisis

Véase el diagrama de flujo y la descripción de las pruebas y los protocolos optimizados en los apéndices pertinentes:

Aislamiento selectivo (véase la sección VI.A.4)

Prueba IF (véase la sección VI.A.5)

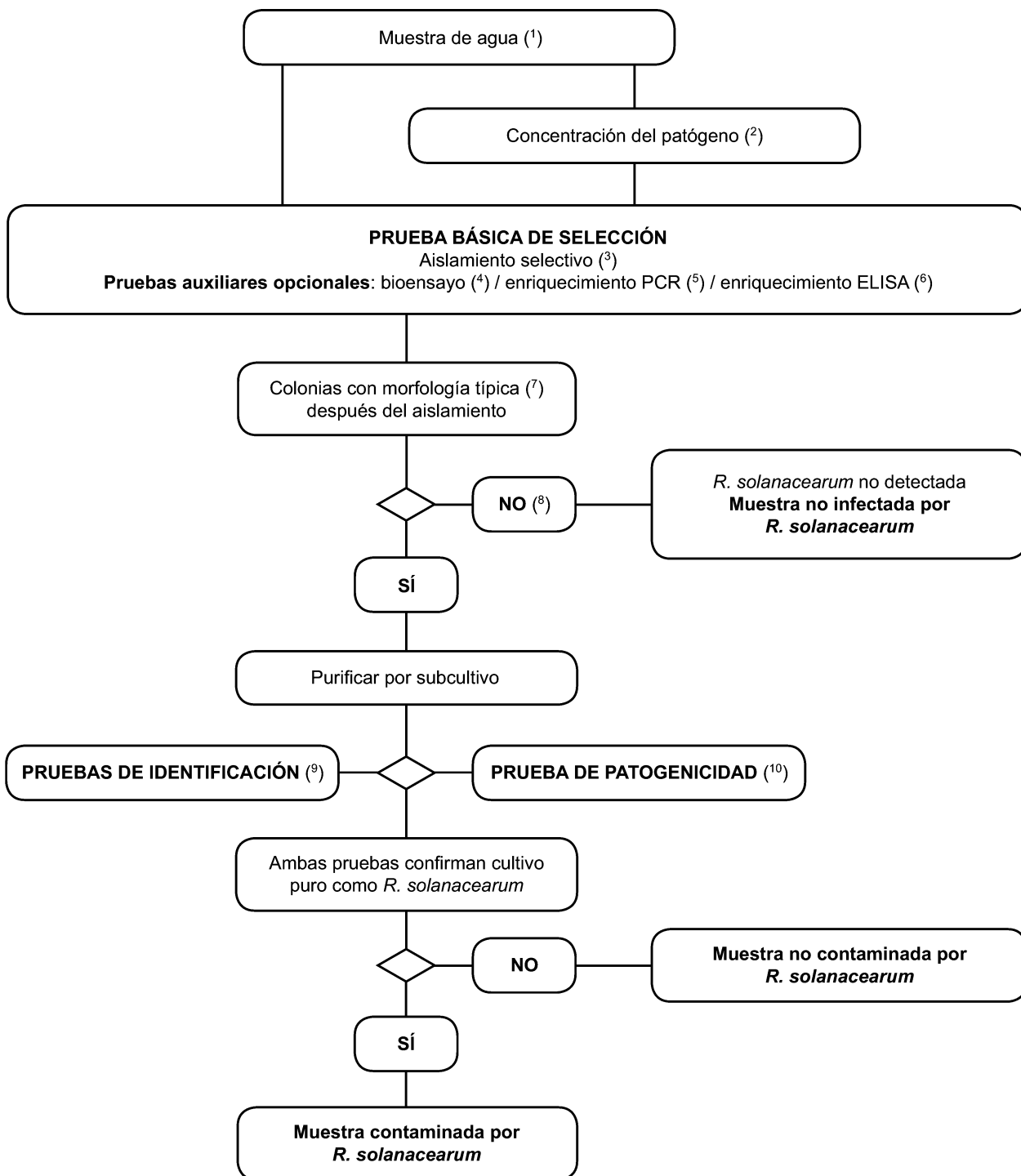
Pruebas PCR (véase la sección VI.A.6)

Prueba FISH (véase la sección VI.A.7)

Pruebas ELISA (véase la sección VI.A.8)

Bioensayo (véase la sección VI.A.9)

SECCIÓN IV

1. Esquema del método de detección e identificación de *R. solanacearum* en el agua

- (¹) Véase la sección IV.2.1 para los tamaños recomendados de las muestras.
- (²) En la sección IV.2.1 se describen los métodos de concentración de patógenos. La concentración incrementa las poblaciones de patógenos y de bacterias saprofitas competidoras, y únicamente se recomienda si no provoca una inhibición de la prueba de aislamiento.
- (³) En la sección VI.A.4 se describe la prueba de aislamiento selectivo.
- (⁴) En la sección VI.A.9 se describe la prueba del bioensayo.
- (⁵) En las secciones VI.A.4.2 y VI.A.6 se describen los métodos de enriquecimiento PCR.
- (⁶) En las secciones VI.A.4.2 y VI.A.8 se describen los métodos de enriquecimiento ELISA.
- (⁷) La morfología típica de la colonia se describe en la sección II.3.d.
- (⁸) El cultivo puede fallar debido a la competencia o la inhibición por bacterias saprofitas. Si se sospecha que una elevada población saprofita afecta a la fiabilidad del aislamiento, repetir entonces las pruebas de aislamiento tras la dilución de la muestra en agua estéril.
- (⁹) La identificación fiable de cultivos puros presuntamente de aislados de *R. solanacearum* se efectúa utilizando las pruebas descritas en la sección VI.B.
- (¹⁰) La prueba de patogenicidad se describe en la sección VI.C.

2. Métodos de detección e identificación de *R. solanacearum* en el agua

Principio

El método validado de detección que se describe en la presente sección es aplicable a la detección del patógeno en muestras de aguas superficiales y puede aplicarse asimismo a las muestras para análisis del proceso de transformación de la patata o de aguas residuales. No obstante, es importante señalar que la sensibilidad previsible de la detección variará en función del sustrato. La sensibilidad de la prueba de aislamiento se ve afectada por las poblaciones de bacterias saprofitas competidoras, que son generalmente muy superiores en el proceso de transformación de la patata y las aguas residuales que en las aguas superficiales. Si bien se espera que el método que se describe a continuación solamente detecte 10^3 células por litro de aguas superficiales, la sensibilidad de la detección en el proceso de transformación de la patata o las aguas residuales será con toda probabilidad mucho menor. Por este motivo, se recomienda analizar las aguas residuales después de todo tratamiento de purificación (por ejemplo, sedimentación o filtración), durante el cual las poblaciones de bacterias saprofitas se reducen. Deberán tenerse en cuenta las limitaciones de sensibilidad del método de prueba a la hora de evaluar la fiabilidad de cualquier resultado negativo obtenido. Si bien se ha utilizado con éxito este método en trabajos de investigación para determinar la presencia o ausencia del patógeno en las aguas superficiales, deberán tenerse en cuenta sus limitaciones cuando se utilice en investigaciones similares del proceso de transformación de la patata o de aguas residuales.

2.1. Preparación de la muestra

Nota:

- La detección de *R. solanacearum* en las aguas superficiales es más fiable a finales de primavera, en verano y en otoño, cuando las temperaturas del agua superan los 15 °C.
- Un muestreo repetido en diferentes momentos durante los períodos mencionados en puntos de muestreo designados incrementará la fiabilidad de la detección al reducir los efectos de la variación climática.
- Ténganse en cuenta los efectos de las fuertes precipitaciones y la geografía del curso de agua a fin de evitar que se produzcan importantes efectos de dilución que puedan ocultar la presencia del patógeno.
- Tomar muestras de agua superficial en las inmediaciones de plantas huésped si estos huéspedes están presentes.

2.1.1. Recoger muestras de agua en puntos de muestreo seleccionados llenando botellas o tubos estériles desechables, a una profundidad, si es posible, por debajo de 30 cm y a 2 m de la orilla. Para los efluentes resultantes de la transformación de la patata y las aguas residuales, recoger muestras en el punto de vertido de las aguas residuales. Se recomiendan las muestras de hasta 500 ml por punto de muestreo. Si se prefieren muestras más pequeñas, se aconseja tomar muestras como mínimo en tres ocasiones por punto de muestreo, cada una de las cuales consistirá en dos submuestras duplicadas de un mínimo de 30 ml. Para un trabajo de investigación intensivo, seleccione como mínimo tres puntos de muestreo por 3 km de curso de agua y asegúrese de que también se toman muestras en los afluentes que desembocan en el curso de agua.

2.1.2. Transportar las muestras en un entorno fresco y oscuro (4-10 °C) y analizarlas en un plazo de 24 horas.

2.1.3. Si es preciso, podrá concentrarse la fracción bacteriana utilizando uno de los métodos siguientes:

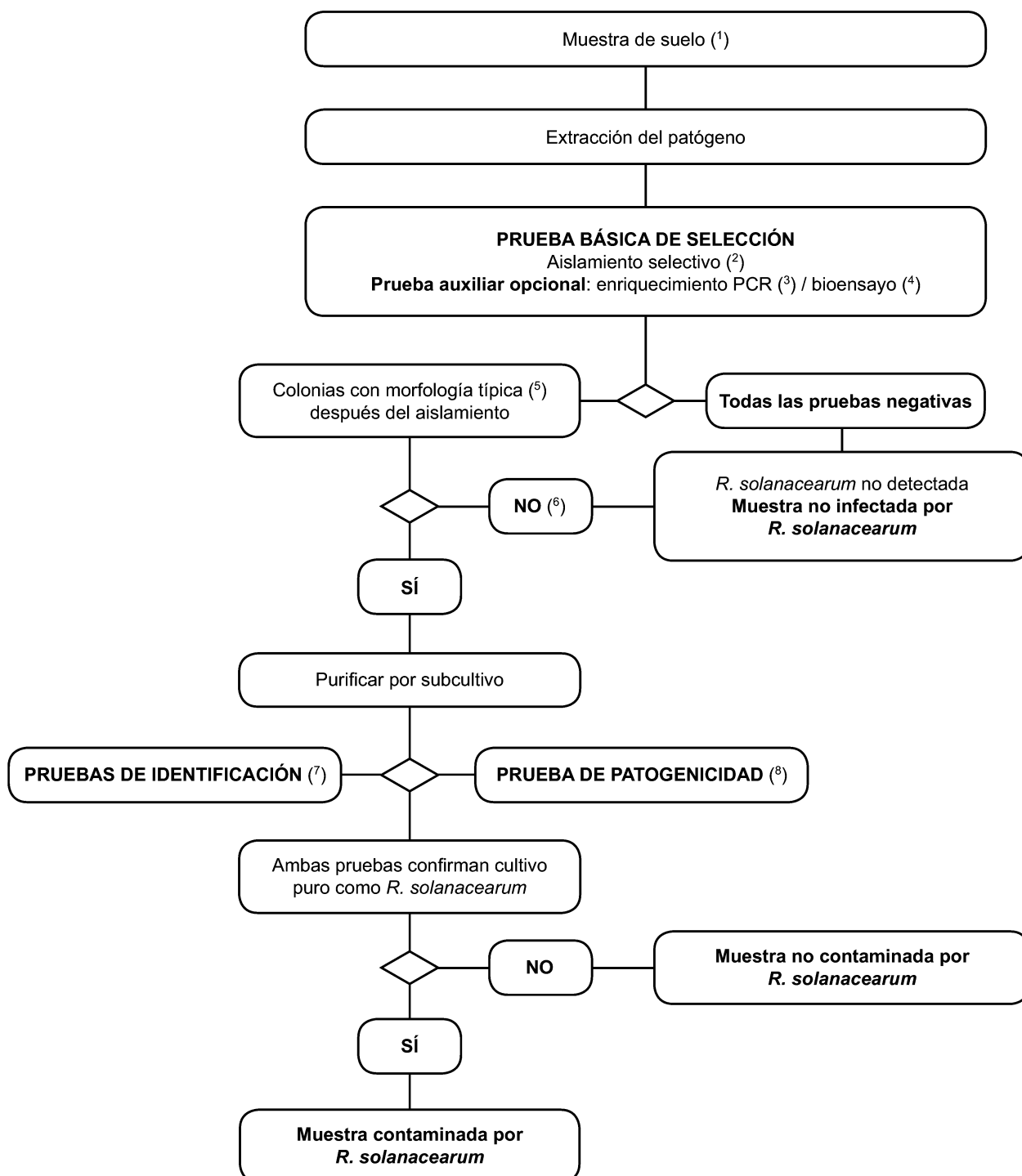
- a) centrifugar 30-50 ml de submuestras de 10 000 g durante diez minutos (o 7 000 g durante 15 minutos), preferiblemente a 4-10 °C, descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 1 ml de tampón de precipitado (apéndice 4);
- b) filtración por membrana (tamaño mínimo de los poros de 0,45 µm) y a continuación lavado del filtro en 5-10 ml de tampón de precipitado y retención de los lavados. Este método es adecuado para grandes volúmenes de agua que contengan bajos niveles de saprofitas.

No suele aconsejarse la concentración para muestras del proceso de transformación de la patata o de aguas residuales, ya que unas poblaciones mayores de bacterias saprofitas competidoras inhibirán la detección de *R. solanacearum*.

2.2. Análisis

Véase el diagrama de flujo y la descripción de las pruebas en los apéndices pertinentes.

SECCIÓN V

1. Esquema del método de detección e identificación de *R. solanacearum* en el suelo

- (¹) Véase la sección V.2.1 para los tamaños recomendados de las muestras.
- (²) En la sección VI.A.4 se describe la prueba de aislamiento selectivo.
- (³) En las secciones VI.A.4.2 y VI.A.6 se describen los métodos de enriquecimiento PCR.
- (⁴) En la sección VI.A.9 se describe la prueba del bioensayo.
- (⁵) La morfología típica de la colonia se describe en la sección II.3.d.
- (⁶) El cultivo puede fallar debido a la competencia o la inhibición por bacterias saprofitas. Si se sospecha que una elevada población saprofita afecta a la fiabilidad del aislamiento, repetir entonces las pruebas de aislamiento tras la dilución de la muestra.
- (⁷) La identificación fiable de cultivos puros presuntamente aislados de *R. solanacearum* se efectúa utilizando las pruebas descritas en la sección VI.B.
- (⁸) La prueba de patogenicidad se describe en la sección VI.C.

2. Métodos de detección e identificación de *R. solanacearum* en el suelo

Principios

El método validado de detección que se describe en la presente sección es aplicable a la detección del patógeno en muestras del suelo, pero también puede utilizarse para analizar muestras de residuos sólidos de la transformación de la patata o de lodos de depuradora. No obstante, debe señalarse que estos métodos no son lo suficientemente sensibles para asegurar la detección de poblaciones pequeñas y/o irregularmente distribuidas de *R. solanacearum* que pueden encontrarse en muestras naturalmente infectadas de estos sustratos.

Deberán tenerse en cuenta las limitaciones de sensibilidad de este método de prueba a la hora de evaluar la fiabilidad de cualquier resultado negativo obtenido, así como cuando se utilice en investigaciones para determinar la presencia o ausencia del patógeno en el suelo o los lodos. El método más fiable para determinar la presencia del patógeno en el suelo del campo es plantar un posible huésped del mismo y supervisar si se produce infección, pero incluso con este método no se detectarán niveles bajos de contaminación.

2.1. Preparación de la muestra

2.1.1. El muestreo del suelo del campo deberá seguir los principios habituales utilizados para el muestreo de nematodos. Recoger entre 0,5 y 1 kg de suelo por muestra de 60 lugares de 0,3 ha de una profundidad de 10 a 20 cm (o de una cuadrícula de 7 × 7 metros). Si se sospecha la presencia del patógeno, incrementar el número de puntos de recogida a 120 por 0,3 ha. Mantener las muestras a una temperatura comprendida entre 12 y 15 °C antes del análisis. Tomar muestras de la transformación de la patata y de lodos de depuradora, recogiendo un total de 1 kg de sitios que representen el volumen total de lodos que se analizará. Mezclar adecuadamente cada muestra antes del análisis.

2.1.2. Dispersar submuestras de 10 a 25 g de suelo o lodos mediante agitación rotatoria (250 rpm) en 60-150 ml de tampón de extracción (apéndice 4) durante un máximo de dos horas. En caso necesario, el añadido de 0,02 % de Tween-20 estéril y de 10 a 20 g de grava estéril puede contribuir a la dispersión.

2.1.3. Mantener la suspensión a 4 °C durante el análisis.

2.2. Análisis

Véase el diagrama de flujo y la descripción de las pruebas en los apéndices pertinentes.

SECCIÓN VI

PROTOCOLOS OPTIMIZADOS PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *R. SOLANACEARUM*

A. PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO Y DETECCIÓN

1. Prueba de la exudación del tallo

La presencia de *R. solanacearum* en tallos de patata, tomate u otras plantas huésped marchitas puede observarse mediante la sencilla prueba de presunción que se indica a continuación: cortar el tallo justo por encima del nivel del suelo. Suspende la superficie del corte en un tubo de agua limpia. Observar si se produce la característica exudación espontánea de hilos de flujo bacteriano de los haces vasculares cortados unos minutos después.

2. Prueba de la detección de gránulos de poli-β-hidroxibutirato

1. Preparar un frotis de exudado bacteriano procedente del tejido infectado o de un cultivo de 48 horas en un medio YPGA o SPA (apéndice 2) en un portaobjetos.
2. Preparar frotis de control positivos de una cepa de biovar 2 de *R. solanacearum* y, si se considera útil, un frotis de control negativo de un PHB sp. negativo conocido.
3. Dejar que se seque al aire y pasar con rapidez varias veces por la llama la cara inferior del portaobjetos para fijar los frotis.
4. Teñir el preparado con azul Nilo A o negro Sudán B y observar microscópicamente tal como se describe a continuación.

Prueba del azul Nilo

- a) Bañar cada portaobjetos con una solución acuosa de azul Nilo A al 1 % e incubar durante diez minutos a 55 °C.
- b) Ecurrir la solución de tinción. Lavar suavemente al grifo durante unos instantes. Eliminar el agua sobrante con un pañuelo de papel.
- c) Bañar el frotis con ácido acético acuoso al 8 % e incubar durante un minuto a temperatura ambiente.
- d) Lavar suavemente al grifo durante unos instantes. Eliminar el agua sobrante con un pañuelo de papel.
- e) Rehumedecer con una gota de agua y tapar con un cubreobjetos.
- f) Examinar el frotis tintado con un microscopio epifluorescente a 450 nm con gota de aceite de inmersión, a 600-1 000 aumentos, utilizando un objetivo de inmersión en aceite o agua.
- g) Observar si se produce la fluorescencia naranja brillante de los gránulos de PHB. Observar también con la luz normal transmitida para cerciorarse de que los gránulos son intracelulares y de que la morfología celular es la típica de *R. solanacearum*.

Prueba del negro Sudán

- a) Bañar cada portaobjetos con una solución acuosa de negro Sudan B al 0,3 % en etanol al 70 % e incubar durante diez minutos a temperatura ambiente.
- b) Ecurrir la solución de tinción y lavar suavemente con agua del grifo durante unos instantes, eliminando el agua sobrante con un pañuelo de papel.
- c) Sumergir brevemente los portaobjetos en xilol y secar con un pañuelo de papel. ¡Cuidado! el xilol es nocivo, deben tomarse las precauciones de seguridad necesarias y debe trabajarse en una campana extractora de humos.
- d) Bañar el frotis con safranina acuosa al 0,5 % (p/v) y dejar durante diez minutos a temperatura ambiente. ¡Cuidado! la safranina es nociva, deben tomarse las precauciones de seguridad necesarias y debe trabajarse en una campana extractora de humos.
- e) Lavar suavemente al grifo durante unos instantes, secar con un pañuelo de papel y tapar con un cubreobjetos.
- f) Examinar los frotis tintados con un microscopio óptico que utilice luz transmitida con aceite de inmersión, a 1 000 aumentos, utilizando un objetivo de inmersión en aceite.
- g) Observar si los gránulos de PHB de las células de *R. solanacearum* se tiñen de negro azulado con un teñido rosáceo de las paredes de las células.

3. Pruebas de aglutinación serológica

La mejor manera de observar la aglutinación de células de *R. solanacearum* en líquido bacteriano o extractos de tejido sintomático es utilizando anticuerpos validados (véase el apéndice 3) etiquetados con marcadores coloreados apropiados tales como células rojas de *Staphylococcus aureus* o partículas coloreadas de látex. Si se utiliza un equipo comercializado (véase el apéndice 3), siga las instrucciones del fabricante. En caso contrario, aplique el procedimiento siguiente:

- a) mezclar gotas de una suspensión de anticuerpos etiquetados y líquido bacteriano (de aproximadamente 5 µl) en pocillos de portaobjetos de pocillos múltiples;
- b) preparar controles positivos y negativos utilizando suspensiones de *R. solanacearum* biovar 2 y una cepa heteróloga;
- c) observar si se produce aglutinación en las muestras positivas tras mezclar suavemente durante 15 segundos.

4. Aislamiento selectivo

4.1. Siembra en medio selectivo

Nota: Antes de utilizar este método por primera vez, efectúe pruebas preliminares a fin de garantizar una detección reproducible de 10^3 a 10^4 unidades formadoras de colonias de *R. solanacearum* por ml añadido a extractos de muestras que hayan dado anteriormente resultados negativos.

Utilizar un medio selectivo validado adecuado tal como SMSA (modificado por Elphinstone *et al.*, 1996; véase el apéndice 2).

Es preciso diferenciar *R. solanacearum* de otras bacterias que pueden desarrollar colonias en el medio. Además, las colonias de *R. solanacearum* pueden mostrar morfologías atípicas si las placas están superpobladas o si también contienen bacterias antagonistas. Cuando se sospeche la existencia de efectos de la competencia o el antagonismo, deberá volver a analizarse la muestra con otro método.

Para lograr la máxima sensibilidad con este método, utilizar extractos de muestras recién preparados. Sin embargo, este método también puede aplicarse a extractos que se hayan almacenado con glicerol entre -68 y -86 °C.

Como controles positivos, preparar diluciones decimales de una suspensión de 10^6 cfu por ml de una cepa virulenta biovar 2 de *R. solanacearum* (por ejemplo, NCPBP 4156 = PD 2762 = CFBP 3857). Para evitar toda posibilidad de contaminación, preparar controles positivos totalmente separados de las muestras que van a analizarse.

Deberá examinarse la adecuación para el crecimiento del patógeno de cada lote recién preparado de un medio selectivo antes de utilizarlo para analizar muestras rutinarias.

Procesar el material de control de la misma manera que la muestra o muestras.

4.1.1. Aplicar una técnica de dilución en placas apropiada a fin de garantizar la dilución de cualquier población saprofita formadora de colonias que pudiera existir. Extender 50-100 μ l por placa de extracto de muestra y de cada dilución.

4.1.2. Incubar las placas a 28 °C. Leer las placas 48 horas después, y posteriormente a diario hasta un máximo de seis días. Las colonias típicas de *R. solanacearum* en el medio SMSA son de color blanco lechoso, planas, irregulares y fluidas y, tras tres días de incubación, se vuelven de color rosa a rojo sangre en el centro con rayas o espirales internas (véase el sitio web: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Nota: En algunos casos se forman colonias atípicas de *R. solanacearum* en este medio. Estas pueden ser pequeñas, redondas, completamente rojas y no fluidas, o solo parcialmente fluidas y, por tanto, difíciles de distinguir de las bacterias saprofitas formadoras de colonias.

4.1.3. Purificar las presuntas colonias de *R. solanacearum* tras el estriado o la dilución en placas en un medio nutritivo general a fin de obtener colonias aisladas (véase el apéndice 2).

4.1.4. Almacenar los cultivos a corto plazo en agua estéril (pH 6-8, sin cloro) a temperatura ambiente en la oscuridad, o a largo plazo en un medio crioprotector adecuado entre -68 y -86 °C o liofilizado.

4.1.5. Identificar los presuntos cultivos (véase la sección VI. B) y efectuar una prueba de patogenicidad (véase la sección VI. C).

Interpretación de los resultados de la siembra en medio selectivo

La siembra en medio selectivo es negativa si no se observan colonias bacterianas al cabo de seis días ni se encuentran presuntas colonias típicas de *R. solanacearum*, siempre que no haya sospechas de inhibición producida por la competencia o el antagonismo de otras bacterias y que en los controles positivos se encuentren colonias típicas de *R. solanacearum*.

La siembra en medio selectivo es positiva si se aíslan presuntas colonias de *R. solanacearum*.

4.2. Procedimiento de enriquecimiento

Utilizar un medio de enriquecimiento validado como el caldo Wilbrink modificado (véase el apéndice 2).

Este procedimiento puede utilizarse para incrementar selectivamente las poblaciones de *R. solanacearum* en extractos de muestras e incrementar la sensibilidad de la detección. Asimismo, este procedimiento diluye efectivamente los inhibidores de la reacción PCR (1:100). Sin embargo, debe señalarse que el enriquecimiento de *R. solanacearum* puede fallar debido a la competencia o el antagonismo de organismos saprofitas, que en muchos casos se enriquecen simultáneamente. Por este motivo, el aislamiento de *R. solanacearum* a partir de cultivos de caldos enriquecidos puede resultar difícil. Además, debido a que pueden incrementarse las poblaciones de saprofitos serológicamente afines, se recomienda la utilización de anticuerpos monoclonales específicos en lugar de anticuerpos policlonales cuando se aplique la prueba ELISA.

- 4.2.1. Para el enriquecimiento PCR, transferir 100 µl de extracto de muestras a 10 ml de caldo de enriquecimiento (apéndice 2) previamente alicuotados en tubos o matraces sin ADN. Para el enriquecimiento ELISA, pueden utilizarse proporciones más elevadas de extracto de muestras en el caldo (por ejemplo, 100 µl en 1,0 ml de caldo de enriquecimiento).
- 4.2.2. Incubar durante 72 horas entre 27 y 30 °C en un cultivo agitado o un cultivo estático manteniendo el tapón del tubo sin apretar para que haya aireación.
- 4.2.3. Mezclar adecuadamente antes de utilizar en las pruebas ELISA o PCR.
- 4.2.4. Tratar el caldo enriquecido de manera idéntica a la muestra o las muestras de las pruebas anteriormente mencionadas.

Nota: Si se prevé una inhibición o un enriquecimiento de *R. solanacearum* debido a las elevadas poblaciones de determinadas bacterias saprofitas competidoras, pueden conseguirse mejores resultados con el enriquecimiento de extractos de muestras antes de cualquier centrifugación o con otras medidas de concentración.

5. Prueba de inmunofluorescencia (prueba IF)

Principio

Se recomienda utilizar la prueba IF como principal prueba de selección debido a su capacidad demostrada para alcanzar los límites requeridos.

Cuando se utilice la prueba IF como principal prueba de selección y su lectura sea positiva, deberá efectuarse la prueba de aislamiento, PCR o FISH como segunda prueba de selección. Cuando se utilice la prueba IF como segunda prueba de selección y su lectura sea positiva, deberá efectuarse una nueva prueba con arreglo al diagrama de flujo para completar el análisis.

Nota: Utilizar una fuente validada de anticuerpos de *R. solanacearum* (véase el sitio web: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Se recomienda determinar el título para cada nuevo lote de anticuerpos. El título se define como la dilución más elevada en la que se produce una reacción óptima cuando se analiza una suspensión que contenga de 10^5 a 10^6 células por ml de la cepa homóloga de *R. solanacearum*, utilizando un conjugado de isotiocianato de fluoresceína (FITC) apropiado, según las recomendaciones del fabricante. Todo el antisero policlonal validado debe presentar un título IF de al menos 1:2 000. Durante el análisis, deberán utilizarse los anticuerpos en diluciones de trabajo cercanas o equivalentes al título.

La prueba debería efectuarse en extractos de muestras recién preparados. En caso necesario, puede realizarse con éxito en extractos almacenados entre -68 y -86 °C en glicerol. El glicerol puede eliminarse de la muestra si se añade 1 ml de tampón de precipitado (véase el apéndice 4), se recentrifuga durante 15 minutos a 7 000 g y se resuspende en un volumen equivalente de tampón de precipitado. En muchos casos no es necesario efectuar este procedimiento, especialmente si las muestras se han fijado en los portaobjetos mediante flameado.

Preparar en otro portaobjetos controles positivos de la cepa homóloga o de cualquier otra cepa de referencia de *R. solanacearum*, suspendida en extracto de patata, tal como se especifica en el apéndice 3, punto B, y opcionalmente en tampón.

Cuando sea posible, deberá utilizarse tejido naturalmente infectado (mantenido por liofilización o congelación entre -16 y -24 °C) como control similar en el mismo portaobjetos.

Pueden utilizarse como controles negativos alícuotas de extracto de muestras que hayan dado anteriormente resultados negativos de *R. solanacearum*.

En el apéndice 3 se enumeran los materiales normalizados de control positivo y negativo que pueden utilizarse en esta prueba.

Utilizar portaobjetos de pocillos múltiples, de preferencia con diez pocillos de 6 mm de diámetro como mínimo.

Procesar el material de control de la misma manera que la muestra o muestras.

5.1. Preparar los portaobjetos según uno de los procedimientos siguientes

- i) Para precipitados con una cantidad relativamente pequeña de sedimento de almidón:

Echar con una pipeta un volumen normalizado medido (15 µl es suficiente para pocillos de 6 mm de diámetro; aumentar el volumen si el diámetro es mayor) de una dilución de 1/100 del precipitado de patata resuspendido en el primer pocillo. A continuación, echar con una pipeta un volumen similar de precipitado sin diluir (1/1) en los pocillos restantes de la fila. La segunda fila puede utilizarse como duplicado o para una segunda muestra, tal como se indica en la figura 1.

- ii) Para otros precipitados:

Preparar diluciones decimales (1/10 y 1/100) del precipitado resuspendido en tampón de precipitado. Echar con una pipeta un volumen normalizado medido (15 µl es suficiente para pocillos de 6 mm de diámetro; aumentar el volumen si el diámetro es mayor) del precipitado resuspendido y de cada dilución en una fila de pocillos. La segunda fila puede utilizarse como duplicado o para una segunda muestra, tal como se indica en la figura 2.

- 5.2. Secar las gotitas a temperatura ambiente o calentándolas entre 40 y 45 °C. Fijar las células bacterianas al portaobjetos calentándolo (15 minutos a 60 °C), flameándolo con etanol del 95 % o con arreglo a las instrucciones específicas de los suministradores de los anticuerpos.

En caso necesario, pueden almacenarse a continuación portaobjetos fijos en un recipiente desecado durante el menor tiempo que resulte necesario (hasta un máximo de 3 meses) antes de efectuar nuevas pruebas.

5.3. Procedimiento IF

- i) Si el portaobjetos se ha preparado según el punto 5.1.i):

Preparar un conjunto de diluciones a 1/2. El primer pocillo deberá contener 1/2 del título (T/2), los otros 1/4 del título (T/4), 1/2 del título (T/2), el título (T) y el doble del título (2T).

- ii) Si el portaobjetos se ha preparado según el punto 5.1.ii):

Preparar la dilución de trabajo (DT) del anticuerpo en el tampón IF. La dilución de trabajo afecta a la especificidad.

Figura 1. Preparación del portaobjetos con arreglo a los puntos 5.1.i) y 5.3.i).

		Diluciones de precipitado resuspendido					
		1/100	1/1	1/1	1/1	1/1	☐ Dilución de precipitado resuspendido
(T = título)		T/2	T/4	T/2	T	2T	☐ Diluciones a 1/2 de antisuero/anticuerpo
Muestra 1		● ₁	● ₂	● ₃	● ₄	● ₅	
Duplicado de muestra 1 o muestra 2		● ₆	● ₇	● ₈	● ₉	● ₁₀	

Figura 2. Preparación del portaobjetos con arreglo a los puntos 5.1.ii) y 5.3.ii).

		Dilución de trabajo de antisuero/anticuerpo					
		1/1	1/10	1/100	vacío	vacío	☐ Dilución decimal de precipitado resuspendido
Muestra 1		● ₁	● ₂	● ₃	● ₄	● ₅	
Duplicado de muestra 1 o muestra 2		● ₆	● ₇	● ₈	● ₉	● ₁₀	

- 5.3.1. Colocar los portaobjetos en un pañuelo de papel humedecido. Cubrir cada pocillo completamente con la dilución o diluciones de anticuerpos. El volumen de anticuerpos aplicado en cada pocillo debe ser como mínimo equivalente al volumen de extracto aplicado.

En caso de que no existan instrucciones específicas de los suministradores de los anticuerpos deberá aplicarse el siguiente procedimiento:

- 5.3.2. Dejar en incubación los portaobjetos en papel húmedo durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C).
- 5.3.3. Sacudir las gotitas de cada portaobjetos y enjuagar cuidadosamente con tampón IF. Lavar por inmersión durante cinco minutos en tampón IF-Tween (apéndice 4) y posteriormente en tampón IF. Evitar la transferencia de aerosoles o gotitas que pudiera provocar contaminaciones cruzadas. Eliminar cuidadosamente el exceso de humedad secándolo suavemente.
- 5.3.4. Colocar los portaobjetos en papel húmedo. Cubrir los pocillos con la dilución del conjugado FITC utilizado para determinar el título. El volumen de conjugado aplicado en los pocillos debe ser idéntico al volumen de anticuerpos aplicado.
- 5.3.5. Dejar en incubación los portaobjetos en papel húmedo durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C).
- 5.3.6. Sacudir las gotitas de conjugado del portaobjetos. Enjuagar y lavar como antes (5.3.3).

Eliminar cuidadosamente el exceso de humedad.

- 5.3.7. Echar con una pipeta 5 a 10 µl de tampón fosfato glicerol de 0,1 M (apéndice 4) o un volumen de solución comercial que proteja la fluorescencia (*antifading*) en cada pocillo y colocar un cubreobjetos.

5.4. Lectura de la prueba IF

- 5.4.1. Examinar los portaobjetos en un microscopio epifluorescente con filtros adecuados para que se produzca la excitación del FITC, con aceite o agua de inmersión y a 500-1 000 aumentos. Recorrer los pocillos a lo largo de dos diámetros perpendiculares entre sí y alrededor del perímetro. En el caso de muestras que presenten un bajo número de células o ninguna, deben observarse como mínimo 40 campos microscópicos.

En primer lugar, comprobar el control positivo. Las células deben ser fluorescentes brillantes y estar completamente teñidas en el título de anticuerpos o la dilución de trabajo determinados. La prueba IF (sección VI.A.5) debe repetirse si la tinción es aberrante.

- 5.4.2. Comprobar si hay células fluorescentes brillantes con morfología característica de *R. solanacearum* en los pocillos de los portaobjetos (véase el sitio web: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). La intensidad de la fluorescencia debe ser equivalente a la de la cepa de control positivo en la misma dilución de anticuerpos. Deberán descartarse las células que presenten una tinción incompleta o cuya fluorescencia sea escasa.

Deberá repetirse la prueba si se sospecha que se ha producido cualquier posible contaminación. Este puede ser el caso cuando todos los portaobjetos de un lote muestren células positivas debido a la contaminación del tampón o si se encuentran células positivas (fuera de los pocillos de los portaobjetos) en la superficie.

- 5.4.3. Existen varios problemas inherentes a las características específicas de la prueba de inmunofluorescencia. En los precipitados de cuñas basales de patata y los precipitados de segmentos del tallo pueden aparecer poblaciones de base de células fluorescentes de morfología atípica y bacterias saprofitas con reacción cruzada cuyo tamaño y morfología sean similares a los de *R. solanacearum*.
- 5.4.4. Tener solamente en cuenta las células fluorescentes con tamaño y morfología típicos en el título o la dilución de trabajo de los anticuerpos, tal como se describe en 5.3.

5.4.5. Interpretación de la lectura de la prueba IF:

- i) si se encuentran células fluorescentes brillantes con morfología característica, estimar el número medio de células típicas por campo microscópico y calcular el número de células típicas por ml de precipitado resuspendido (apéndice 5).

La lectura IF es positiva en las muestras con un mínimo de 5×10^3 células típicas por ml de precipitado resuspendido. Se considera entonces que la muestra puede estar contaminada y deben efectuarse otras pruebas,

- ii) la lectura IF es negativa en las muestras con menos de 5×10^3 células por ml de precipitado resuspendido, y se considera negativa la muestra. No es preciso efectuar más pruebas.

6. Prueba de reacción en cadena de la polimerasa (prueba PCR)

Principios

Cuando se utilice la prueba PCR como principal prueba de selección y dé resultados positivos, deberá efectuarse la prueba de aislamiento o la IF como segunda prueba obligatoria de selección. Cuando se utilice la PCR como segunda prueba de selección y dé resultados positivos, deberán efectuarse las pruebas establecidas en el diagrama de flujo para completar el diagnóstico.

La plena explotación de este método como principal método de selección solo se recomienda en el caso de que se hayan adquirido conocimientos especializados del mismo.

Nota: Las pruebas preliminares realizadas con este método deberían permitir la detección reproducible de 10^3 a 10^4 células de *R. solanacearum* por ml añadidas a los extractos de muestras que previamente arrojaron resultados negativos. Puede ser necesario llevar a cabo experimentos de optimización para lograr niveles máximos de sensibilidad y especificidad en todos los laboratorios.

Utilizar reactivos y protocolos PCR validados (véase el apéndice 6). Seleccionar preferiblemente un método con control interno.

Tomar las precauciones adecuadas para evitar la contaminación de la muestra con el ADN buscado. La prueba PCR debe ser efectuada por técnicos experimentados, en laboratorios especializados en biología molecular, con el fin de reducir al máximo la posibilidad de contaminación con el ADN buscado.

Como muestras finales del procedimiento siempre deben efectuarse controles negativos (para la extracción de ADN y los procedimientos PCR) que dejen constancia de si se ha producido arrastre de ADN.

En la prueba PCR deben incluirse los siguientes controles negativos:

- extracto de la muestra que previamente haya arrojado resultados negativos para *R. solanacearum*,
- controles de los tampones utilizados para extraer la bacteria y el ADN de la muestra,
- mezcla para la reacción PCR.

Deben incluirse los siguientes controles positivos:

- alícuotas de precipitados resuspendidos a los que se ha añadido *R. solanacearum* (para la preparación véase el apéndice 3, punto B),
- una suspensión de 10^6 células por ml de *R. solanacearum* en agua de un aislado virulento (por ejemplo, NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; véase el apéndice 3, punto B),
- siempre que sea posible, utilizar asimismo ADN extraído de las muestras de control positivas en la prueba PCR.

Para evitar toda posible contaminación, preparar los controles positivos en un entorno distinto al de las muestras que vayan a analizarse.

Los extractos de muestras deben contener la cantidad mínima de tierra posible. En determinados casos puede ser recomendable preparar los extractos a partir de patatas lavadas cuando vayan a utilizarse protocolos PCR.

En el apéndice 3 se enumeran los materiales normalizados de control positivo y negativo que pueden utilizarse en esta prueba.

6.1. Métodos de purificación del ADN

Utilizar muestras de control positivas y negativas como se indica más arriba (véase el apéndice 3).

Procesar el material de control de la misma manera que la muestra o muestras.

Existen diferentes métodos para purificar el ADN buscado a partir de sustratos de muestras complejas, separando de esta manera los inhibidores de PCR y otras reacciones enzimáticas y concentrando el ADN buscado en el extracto de la muestra. Se ha optimizado el método siguiente para su utilización con los métodos PCR validados mostrados en el apéndice 6.

a) Método de Pastroik (2000)

- 1) verter con una pipeta 220 µl de tampón de lisis [100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)] en un tubo Eppendorf de 1,5 ml;
- 2) añadir 100 µl de extracto de muestra y colocar en un calentador o al baño maría a 95 °C durante diez minutos;
- 3) colocar el tubo en hielo durante cinco minutos;
- 4) añadir 80 µl de solución estándar de lisozima (50 mg de lisozima por ml en 10 mM Tris HCl, pH 8,0) e incubar a 37 °C durante 30 minutos;
- 5) añadir 220 µl de solución A Easy DNA® (Invitrogen), mezclar adecuadamente por agitación e incubar a 65 °C durante 30 minutos;
- 6) añadir 100 µl de solución B Easy DNA® (Invitrogen) y agitar vigorosamente hasta que el precipitado se mueva libremente en el tubo y la muestra sea uniformemente viscosa;
- 7) añadir 500 µl de cloroformo y agitar hasta que disminuya la viscosidad y la mezcla sea homogénea;
- 8) centrifugar a 15 000 g durante 20 minutos a 4 °C para separar las fases y formar la interfase;
- 9) transferir la fase superior a un tubo Eppendorf sin utilizar;
- 10) añadir 1 ml de etanol al 100 % (– 20 °C), agitar brevemente e incubar en hielo durante diez minutos;
- 11) centrifugar a 15 000 g durante 20 minutos a 4 °C y retirar el etanol del precipitado;
- 12) añadir 500 µl de etanol al 80 % (– 20 °C) y mezclar invirtiendo el tubo;
- 13) centrifugar a 15 000 g durante diez minutos a 4 °C, guardar el precipitado y retirar el etanol;
- 14) dejar que el precipitado se seque al aire o en un Speed Vac de ADN;
- 15) resuspender el precipitado en 100 µl de agua ultrapura estéril y dejar a temperatura ambiente durante un mínimo de 20 minutos;
- 16) almacenar a – 20 °C hasta que se necesite para la prueba PCR;
- 17) centrifugar todo precipitado blanco y utilizar 5 µl del sobrenadante que contenga ADN para la prueba PCR.

b) Otros métodos

Pueden aplicarse otros métodos de extracción del ADN, como por ejemplo Qiagen DNeasy Plant Kit, siempre que se haya demostrado que son igual de eficaces en la purificación del ADN a partir de muestras de control que contengan de 10^3 a 10^4 células patógenas por ml.

6.2. PCR

- 6.2.1. Preparar plantillas de ensayo y de control para la prueba PCR con arreglo a los protocolos validados (sección VI.A.6). Preparar una dilución decimal de extracto de ADN de la muestra (1:10 en agua ultrapura).
- 6.2.2. Preparar la mezcla de reacción PCR apropiada en un entorno sin contaminación de acuerdo con los protocolos publicados (apéndice 6). Cuando sea posible, se recomienda utilizar un protocolo PCR multiplex que incorpore asimismo un control interno de la prueba PCR.
- 6.2.3. Añadir de 2 a 5 µl de extracto de ADN por 25 µl de reacción PCR en tubos PCR estériles con arreglo a los protocolos PCR (véase el apéndice 6).
- 6.2.4. Incorporar una muestra de control negativo que contenga solo mezcla de reacción PCR y añadir la misma fuente de agua ultrapura utilizada en la mezcla PCR en lugar de la muestra.
- 6.2.5. Colocar los tubos en el mismo termociclador utilizado en las pruebas preliminares y aplicar el programa PCR optimizado adecuado (apéndice 6).

6.3. Análisis del producto de la PCR

- 6.3.1. Resolver los amplicones PCR mediante electroforesis en gel de agarosa. Aplicar como mínimo 12 µl de mezcla de reacción de ADN amplificada de cada muestra mezclada con 3 µl de tampón de carga (apéndice 6) en 2,0 % (w/v) de geles de agarosa en un tampón de tris-acetato-EDTA (TAE) (apéndice 6) a 5-8 V por cm. Utilizar un marcador de ADN adecuado, por ejemplo, 100 bp *ladder*.
- 6.3.2. Revelar las bandas de ADN tiñéndolas con bromuro de etidio (0,5 mg/l) durante 30 a 60 minutos, tomando las precauciones adecuadas para el manejo de este mutágeno.
- 6.3.3. Observar el gel teñido mediante transiluminación en UV de onda corta ($\lambda = 302$ nm) para productos de la PCR amplificados del tamaño esperado (apéndice 6) y anotar los resultados.
- 6.3.4. En relación con todos los nuevos descubrimientos o casos, para verificar la autenticidad del amplicón PCR efectuar un análisis de la enzima de restricción en una muestra del ADN restante amplificado incubando a la temperatura óptima y durante el tiempo necesario con una enzima y un tampón apropiados (véase el apéndice 6). Resolver los fragmentos digeridos mediante electroforesis en gel de agarosa, al igual que antes, y observar el patrón característico del fragmento de restricción con transiluminación UV una vez teñido con bromuro de etidio y comparar con el control positivo no digerido y digerido.

Interpretación de los resultados de la prueba PCR

La prueba PCR es negativa si el amplicón PCR específico de *R. solanacearum* del tamaño esperado no se detecta en la muestra en cuestión pero sí se detecta en todas las muestras de controles positivos (en caso de PCR multiplex con cebadores de control interno específicos de la planta, se debe amplificar con la muestra en cuestión un segundo producto PCR del tamaño esperado).

La prueba PCR es positiva si se detecta el amplicón PCR específico de *R. solanacearum* del tamaño y patrón de restricción esperado (cuando se exija), siempre que no se amplifique a partir de ninguna de las muestras de control negativo. La confirmación fiable de un resultado positivo puede obtenerse también repitiendo la prueba con un segundo conjunto de cebadores de la PCR (apéndice 6).

Nota: Puede sospecharse la inhibición de la PCR si el amplicón esperado se obtiene a partir de la muestra de control positivo que contiene *R. solanacearum* en agua, pero se obtienen resultados negativos de los controles positivos con *R. solanacearum* en extracto de patata. En protocolos PCR multiplex con controles PCR internos, la inhibición de la reacción se indica cuando no se obtiene ninguno de los dos amplicones.

Puede sospecharse la existencia de contaminación si el amplicón esperado se obtiene a partir de uno o varios de los controles negativos.

7. Prueba de hibridación fluorescente in situ (prueba FISH)

Principio

Cuando se utilice la prueba FISH como primera prueba de selección y esta arroje resultados positivos, deberá efectuarse la prueba de aislamiento o la prueba IF como segunda prueba obligatoria de selección. Cuando se utilice la prueba FISH como segunda prueba de selección y dé resultados positivos, deberán efectuarse las pruebas establecidas en el diagrama de flujo para completar el diagnóstico.

Nota: Utilizar oligosondas específicas para *R. solanacearum* validadas (véase el apéndice 7). Las pruebas preliminares realizadas con este método deberían permitir la detección reproducible de al menos 10^3 a 10^4 células de *R. solanacearum* por ml añadidas a los extractos de muestras que hayan dado anteriormente resultados negativos.

El procedimiento siguiente debería efectuarse, a ser posible, con extracto de muestra recién preparado, pero también puede realizarse con éxito con extracto de muestra que se haya almacenado en glicerol a una temperatura comprendida entre -16 y -24 °C o entre -68 y -86 °C.

Utilizar como controles negativos alícuotas de extracto de muestras que hayan dado previamente resultados negativos para *R. solanacearum*.

Como controles positivos, preparar suspensiones que contengan de 10^5 a 10^6 células por ml de *R. solanacearum* biovar 2 (por ejemplo la cepa NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; véase el apéndice 3) en tampón de fosfato de 0,01 M de un cultivo de tres a cinco días. Preparar en otro portaobjetos controles positivos de la cepa homóloga o de cualquier otra cepa de referencia de *R. solanacearum*, suspendida en extracto de patata, tal como se especifica en el apéndice 3, punto B.

El uso de una oligosonda eubacteriana con etiqueta FITC ofrece un control para el proceso de hibridación, ya que teñirá todas las eubacterias presentes en la muestra.

En el apéndice 3, punto A, se enumeran los materiales normalizados de control positivo y negativo que pueden utilizarse en esta prueba.

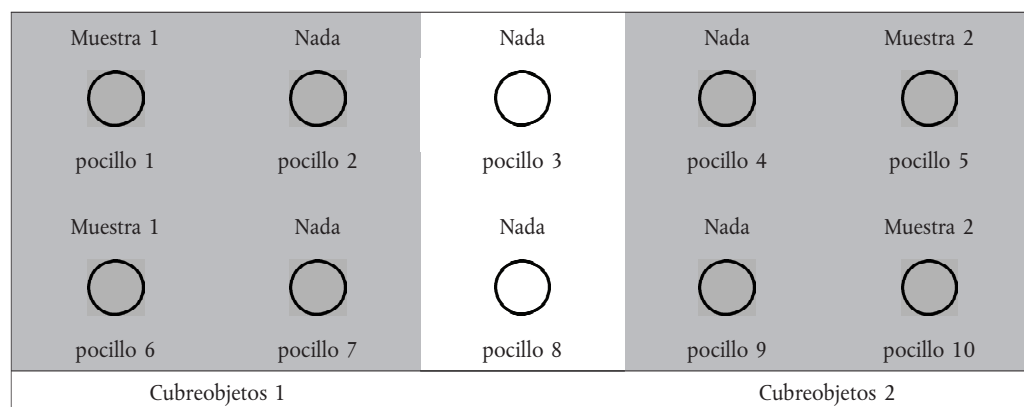
Procesar el material de control de la misma manera que la muestra o muestras.

7.1. Fijación del extracto de patata

El protocolo siguiente se basa en Wullings *et al.* (1998).

- 7.1.1. Preparar la solución de fijación (véase el apéndice 7).
- 7.1.2. Verter 100 µl de cada extracto de muestra en un tubo Eppendorf y centrifugar durante siete minutos a 7 000 g.
- 7.1.3. Separar el sobrenadante y disolver el precipitado en 200 µl de solución fijadora preparada con menos de 24 horas de antelación. Agitar e incubar durante una hora en el refrigerador.
- 7.1.4. Centrifugar durante siete minutos a 7 000 g, separar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 75 µl de tampón de fosfato de concentración 0,01 M (véase el apéndice 7).
- 7.1.5. Colocar 16 µl de las suspensiones fijadas en un portaobjetos múltiple limpio, tal como muestra la figura 7.1. Aplicar dos muestras diferentes por portaobjetos sin diluir y utilizar 10 µl para realizar una dilución a 1:100 (en tampón de fosfato de concentración 0,01 M). La solución de la muestra restante (49 µl) puede almacenarse a -20 °C tras la adición de 1 volumen de etanol al 96 %. En caso de que sea necesario repetir la prueba FISH, separar el etanol mediante centrifugación y añadir un volumen equivalente de tampón de fosfato de concentración 0,01 (mezclar mediante agitación).

Figura 7.1. Distribución del portaobjetos para la prueba FISH.



- 7.1.6. Secar los portaobjetos al aire (o con secador de portaobjetos a 37 °C) y fijarlos flameándolos.

El procedimiento puede interrumpirse en esta fase, pudiéndose proseguir con la hibridación al día siguiente. Los portaobjetos deben almacenarse secos y sin polvo a temperatura ambiente.

7.2. Hibridación

- 7.2.1. Deshidratar las células en series de etanol escalonadas al 50 %, 80 % y 96 % durante un minuto cada una. Secar las preparaciones en un portaobjetos.

- 7.2.2. Preparar una cámara de incubación húmeda recubriendo el fondo de una caja hermética con papel de seda o de filtro empapado en 1x hybmix (apéndice 7). Preincubar la caja en el horno de hibridación a 45 °C durante un mínimo de diez minutos.

- 7.2.3. Aplicar 10 µl de solución de hibridación (apéndice 7) a ocho pocillos (pocillos 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 y 10; véase la figura 7.1) de cada portaobjetos dejando vacíos los dos pocillos centrales (3 y 8).

- 7.2.4. Aplicar cubreobjetos (24 × 24 mm) al primer y a los cuatro últimos pocillos evitando la entrada de aire. Colocar los portaobjetos en la cámara húmeda precalentada y dejar que se produzca la hibridación durante cinco horas a 45 °C en la oscuridad.

- 7.2.5. Preparar tres vasos de precipitado que contengan 1 l de agua Milli Q (grado molecular), 1 l de 1x hybmix (334 ml 3x hybmix y 666 ml agua Milli Q) y 1 l de 1/8x hybmix (42 ml 3x hybmix y 958 ml agua Milli Q). Preincubarlos al baño maría a 45 °C.

- 7.2.6. Quitar los cubreobjetos de las preparaciones y colocar estas en un portaobjetos.

- 7.2.7. Lavar el exceso de sonda mediante incubación durante 15 minutos en el vaso de precipitado con 1x hybmix a 45 °C.

- 7.2.8. Transferir el portaobjetos a una solución de lavado de hybmix a 1/8 e incubar durante otros 15 minutos.

- 7.2.9. Sumergir las preparaciones brevemente en agua Milli Q y colocarlas en papel de filtro. Eliminar el exceso de humedad cubriendo la superficie con cuidado con papel de filtro. Verter de 5 a 10 µl de solución de montaje protectora de la fluorescencia (por ejemplo Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA, o equivalente) en cada pocillo y aplicar un cubreobjetos grande (24 × 60 mm) sobre la totalidad de la preparación.

7.3. Lectura de la prueba FISH

- 7.3.1. Los portaobjetos deben examinarse inmediatamente utilizando un microscopio epifluorescente a 630 o 1 000 aumentos con aceite de inmersión. Con un filtro adecuado para isotiocianato de fluoresceína (FITC), las células eubacterianas (incluida la mayoría de las células gramnegativas) de la muestra aparecen teñidas de verde fluorescente. Utilizando un filtro para tetrametilrodamina-5-isotiocianato, las células de *R. solanacearum* marcadas con Cy3 aparecen teñidas de rojo fluorescente. Comparar la morfología de las células con la de los controles positivos. Las células deben ser fluorescentes brillantes y estar completamente teñidas. La prueba FISH (sección VI.A.7) debe repetirse si la tinción es aberrante. Recorrer los pocillos a lo largo de dos diámetros perpendiculares entre sí y alrededor del perímetro. En el caso de muestras que presenten un bajo número de células o ninguna, deben observarse como mínimo 40 campos microscópicos.

- 7.3.2. Comprobar si hay células fluorescentes brillantes con la morfología característica de *R. solanacearum* en los pocillos de los portaobjetos (véase el sitio web: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). La intensidad de la fluorescencia debe ser equivalente o mejor que la de la cepa de control positivo. Deberán descartarse las células que presenten una tinción incompleta o cuya fluorescencia sea escasa.

- 7.3.3. Deberá repetirse la prueba si se sospecha que se ha producido cualquier posible contaminación. Este puede ser el caso cuando todos los portaobjetos de un lote muestren células positivas debido a la contaminación del tampón o si se encuentran células positivas (fuera de los pocillos de los portaobjetos) en la superficie.

- 7.3.4. Existen varios problemas inherentes a la especificidad de la prueba FISH. En los precipitados de cuñas basales de patata y de segmentos del tallo pueden aparecer poblaciones de base de células fluorescentes de morfología atípica y bacterias saprofitas con reacción cruzada cuyo tamaño y morfología sean similares a los de *R. solanacearum*, aunque con mucha menor frecuencia que en la prueba IF.
- 7.3.5. Ténganse en cuenta únicamente las células fluorescentes de tamaño y morfología típicos.
- 7.3.6. Interpretación de los resultados de la prueba FISH
- Se obtendrán resultados válidos en la prueba FISH siempre que en todos los controles positivos y en ninguno de los controles negativos se observen células teñidas de verde fluorescente brillante, cuyo tamaño y morfología sean los típicos de las de *R. solanacearum*, cuando se utilice el filtro FITC, y células teñidas de rojo fluorescente brillante cuando se utilice el filtro de rodamina. Si se encuentran células fluorescentes brillantes con morfología característica, estimar el número medio de células típicas por campo microscópico y calcular el número de células típicas por ml de precipitado resuspendido (apéndice 4). Las muestras que presenten al menos 5×10^3 células típicas por ml de precipitado resuspendido se consideran potencialmente contaminadas. Es preciso efectuar nuevas pruebas. Las muestras que presenten menos de 5×10^3 células típicas por ml de precipitado resuspendido se consideran negativas.
 - Los resultados de la prueba FISH serán negativos cuando no se observen células teñidas de rojo fluorescente brillante con un tamaño y morfología típicos de *R. solanacearum* utilizando el filtro de rodamina, siempre que se observen células teñidas de rojo fluorescente brillante típicas en las preparaciones de control positivo cuando se utilice el filtro de rodamina.

8. Pruebas de ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA)

Principio

Las pruebas ELISA solamente pueden utilizarse como prueba opcional además de las pruebas IF, PCR o FISH, debido a la sensibilidad relativamente baja de esta prueba. Cuando se utilice DAS ELISA, es obligatorio efectuar un enriquecimiento y utilizar anticuerpos monoclonales (véase el sitio web: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Puede resultar de utilidad efectuar un enriquecimiento de las muestras antes de utilizar la prueba ELISA a fin de incrementar la sensibilidad de la prueba, pero puede fracasar debido a la competencia de otros organismos en la muestra.

Nota: Utilizar una fuente validada de anticuerpos de *R. solanacearum* (véase el sitio web: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Se recomienda determinar el título para cada nuevo lote de anticuerpos. El título se define como la dilución más elevada en la que se produce una reacción óptima cuando se analiza una suspensión que contenga de 10^5 a 10^6 células por ml de la cepa homóloga de *R. solanacearum*, utilizando conjugados de anticuerpos secundarios apropiados, según las recomendaciones del fabricante. Durante el análisis, deben utilizarse los anticuerpos en diluciones de trabajo cercanas o equivalentes a la formulación comercial.

Determinar el título de los anticuerpos en una suspensión de 10^5 a 10^6 células por ml de la cepa homóloga de *R. solanacearum*.

Incluir una muestra de extracto que haya dado previamente resultados negativos para *R. solanacearum* y una suspensión de una bacteria que no tenga reacción cruzada en tampón fosfato salino (PBS) como controles negativos.

Como control positivo utilizar alícuotas de extracto de muestra que haya dado previamente resultados negativos, mezcladas con 10^3 a 10^4 células por ml de *R. solanacearum* biovar 2 (por ejemplo, cepa NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; véase el apéndice 3, puntos A y B). Para la comparación de los resultados de cada placa utilizar una suspensión normalizada de 10^5 a 10^6 células por ml en PBS de *R. solanacearum*. Debe asegurarse que los controles positivos estén bien separados en la placa de microtitulación de la muestra o las muestras analizadas.

En el apéndice 3, punto A, se enumeran los materiales normalizados de control positivo y negativo que pueden utilizarse en esta prueba.

Procesar el material de control de la misma manera que la muestra o muestras.

Se han validado dos protocolos ELISA:

a) ELISA indirecta (Robinson Smith *et al.*, 1995):

- utilizar de 100 a 200 μ l de alícuotas de extracto de muestra. (Si se calienta a 100 °C durante cuatro minutos al baño maría o un calentador pueden reducirse en algunos casos los resultados no específicos);
- añadir un volumen igual de tampón de tapizado de doble concentración (apéndice 4) y agitar;
- aplicar 100 μ l de alícuotas a cada uno de al menos dos pocillos de una placa de microtitulación (por ejemplo, Nunc-Polysorp o equivalente) e incubar durante una hora a 37 °C o durante una noche a 4 °C;

- 4) quitar los extractos de los pocillos. Lavar estos tres veces con PBS-Tween (apéndice 4), dejando en ellos la última solución de lavado durante al menos cinco minutos;
- 5) preparar la dilución adecuada de anticuerpos contra *R. solanacearum* en tampón de bloqueo (apéndice 4). Para anticuerpos comerciales validados, utilizar las diluciones recomendadas (normalmente una concentración que duplique el título);
- 6) añadir 100 µl a cada pocillo e incubar durante una hora a 37 °C;
- 7) quitar la solución de anticuerpos de los pocillos y lavar como se describe en el punto 4;
- 8) preparar la dilución adecuada de conjugado de fosfatasa alcalina de anticuerpos secundarios en tampón de bloqueo. Añadir 100 µl a cada pocillo e incubar durante una hora a 37 °C;
- 9) quitar los anticuerpos conjugados de los pocillos y lavar como se describe en el punto 4;
- 10) añadir 100 µl de solución de sustrato de fosfatasa alcalina (apéndice 4) a cada pocillo. Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente y leer la absorbencia a 405 nm a intervalos regulares durante 90 minutos.

b) DASI (doble sandwich de anticuerpos indirecto) ELISA:

- 1) preparar la dilución adecuada de inmunoglobulinas policlonales contra *R. solanacearum* en tampón de bloqueo de pH 9,6 (apéndice 4). Añadir 200 µl a cada pocillo. Incubar a 37 °C de cuatro a cinco horas o a 4 °C durante 16 horas;
- 2) lavar tres veces los pocillos con PBS-Tween (apéndice 4).

Añadir 190 µl de extracto de muestra a como mínimo dos pocillos. Añadir asimismo controles positivos y negativos en dos pocillos de cada placa. Incubar durante 16 horas a 4 °C;

- 3) lavar tres veces los pocillos con PBS-Tween (apéndice 4);
- 4) preparar una dilución apropiada de anticuerpos monoclonales específicos de *R. solanacearum* en PBS (apéndice 4) que contenga asimismo 0,5 % de seroalbúmina bovina (BSA) y añadir 190 µl a cada pocillo. Incubar a 37 °C durante dos horas;
- 5) lavar tres veces los pocillos con PBS-Tween (apéndice 4);
- 6) preparar una dilución apropiada de inmunoglobulinas anti-ratón conjugadas con fosfatasa alcalina en PBS. Añadir 190 µl a cada pocillo. Incubar a 37 °C durante dos horas;
- 7) lavar tres veces los pocillos con PBS-Tween (apéndice 4);
- 8) preparar una solución de sustrato de fosfatasa alcalina que contenga 1 mg de p-nitrofenil fosfato por ml de tampón de sustrato (apéndice 4). Añadir 200 µl a cada pocillo. Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente y leer la absorbencia a 405 nm a intervalos regulares durante 90 minutos.

Interpretación de los resultados de la prueba ELISA

La prueba ELISA es negativa si la lectura media de la densidad óptica (DO) de pocillos de muestras duplicadas es < 2 veces la DO del pocillo de control del extracto de muestra negativa, siempre y cuando todas las DO de los controles positivos sean superiores a 1,0 (tras 90 minutos de incubación con el sustrato) y sean más de dos veces superiores a la DO obtenida a partir de extractos de muestra negativa.

La prueba ELISA es positiva si las lecturas medias de la DO de los pocillos de muestra duplicados es > 2 veces la DO en el pocillo del extracto de muestra negativa, siempre y cuando las lecturas de DO en todos los pocillos de control negativo sean < 2 veces las de los pocillos de control positivo.

Las lecturas ELISA negativas en pocillos de control positivo indican que no se ha efectuado correctamente la prueba o que ha estado inhibida. Las lecturas ELISA positivas en pocillos de control negativo indican que se ha producido contaminación cruzada o unión de anticuerpos no específicos.

9. Prueba de bioensayo

Nota: Las pruebas preliminares realizadas con este método deberían permitir la detección reproducible de 10^3 a 10^4 unidades formadoras de colonias de *R. solanacearum* por ml añadidas a los extractos de muestras que previamente arrojaron resultados negativos (para la preparación véase el apéndice 3).

Se puede alcanzar la máxima sensibilidad de detección cuando se utilicen extractos de muestras que se acaben de preparar y cuando las condiciones de cultivo sean las óptimas. No obstante, este método puede aplicarse también con éxito a extractos que se hayan almacenado en glicerol a una temperatura comprendida entre -68 y -86 °C.

El protocolo siguiente se basa en Janse (1988):

- 9.1. Utilizar diez plantas de prueba de un cultivar de tomate sensible (por ejemplo, Moneymaker o cultivar con sensibilidad equivalente determinado por el laboratorio de análisis) en la fase de la tercera hoja verdadera para cada muestra. Para más detalles de cultivo, véase el apéndice 8. Otra alternativa es utilizar berenjenas (por ejemplo, cultivar Black Beauty o cultivares con sensibilidad equivalente), únicamente plantas en fase de hoja 2-3 hasta la plena expansión de la tercera hoja verdadera. Se ha observado que los síntomas son menos graves y que se desarrollan más lentamente en la berenjena. Por tanto, cuando sea posible se recomienda utilizar plántulas de tomate.

- 9.2. Distribuir 100 µl de extracto de muestra entre las plantas analizadas.

- 9.2.1. Inoculación con jeringa

Inocular los tallos de las patatas justo por encima de los cotiledones con una jeringa provista de una aguja hipodérmica (no menos de 23G). Distribuir la muestra entre las plantas analizadas.

- 9.2.2. Inoculación en estrías

Sosteniendo la planta entre dos dedos, aplíquese con una pipeta una gota (de unos 5-10 µl) del precipitado en suspensión en el tallo situado entre los cotiledones y la primera hoja.

Con un bisturí estéril practicar una incisión diagonal de aproximadamente 1,0 cm de largo y una profundidad de aproximadamente 2/3 del grosor del tallo, comenzando el corte a partir de la gota del precipitado.

Sellar el corte con vaselina estéril utilizando una jeringa.

- 9.3. Inocular con la misma técnica cinco plantones con una suspensión acuosa de 10^5 a 10^6 células por ml preparada a partir de un cultivo de 48 horas de una cepa biovar 2 virulenta de *R. solanacearum* como control positivo y con tampón de precipitado (apéndice 4) como control negativo. Separar las plantas de control positivo y negativo de las otras para evitar la contaminación cruzada.

- 9.4. Cultivar las plantas de prueba en instalaciones de cuarentena hasta un máximo de cuatro semanas entre 25 y 30 °C con elevada humedad relativa, regándolas adecuadamente para evitar que se aneguen o se marchiten por deficiencia hídrica. Para evitar la contaminación se deben incubar las plantas de control positivo y negativo en bancos claramente separados en un invernadero o cámara de cultivo; en el caso de que se disponga de un espacio reducido, garantizar la estricta separación entre tratamientos. En el caso de que deban incubarse juntas plantas para distintas muestras, deben separarse con las pantallas adecuadas. Durante la fertilización, el riego, la inspección y cualquier otra manipulación deben extremarse las precauciones para evitar la contaminación cruzada. Es esencial mantener los invernaderos y las cámaras libres de toda plaga de insectos, ya que estos pueden transmitir la bacteria de una muestra a otra.

Comprobar si se aprecian síntomas de marchitamiento, epinastia, clorosis y/o crecimiento reducido.

- 9.5. Aislarlas de las plantas infectadas (sección II.3) e identificar cultivos purificados de presunta *R. solanacearum* (sección VI. B).
- 9.6. Si no se observan síntomas después de tres semanas, efectuar una prueba IF/PCR/Aislamiento en una muestra mixta de secciones de 1 cm del tallo de cada planta analizada, tomadas por encima del punto de inoculación. Si la prueba es positiva, efectuar una dilución en placas (sección 4.1).
- 9.7. Identificar cualquier cultivo purificado de presunta *R. solanacearum* (sección VI. B).

Interpretación de los resultados de la prueba del bioensayo

Se obtienen resultados válidos de la prueba del bioensayo cuando las plantas del control positivo muestran síntomas típicos, pueden reaislarse las bacterias de estas plantas y no se encuentran síntomas en los controles negativos.

La prueba del bioensayo es negativa si las plantas analizadas no están infectadas por *R. solanacearum*, siempre que se detecte *R. solanacearum* en los controles positivos.

La prueba del bioensayo es positiva si las plantas analizadas están infectadas por *R. solanacearum*.

B. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN

Identificar cultivos puros de aislados de presunta *R. solanacearum* utilizando al menos dos de las pruebas siguientes basadas en principios biológicos diferentes.

Cuando proceda, incluir cepas de referencia conocidas para cada prueba efectuada (véase el apéndice 3).

1. Pruebas de identificación nutricional y enzimática

Determinar las propiedades fenotípicas siguientes que estén universalmente presentes o ausentes en *R. solanacearum*, de acuerdo con los métodos de Lelliott y Stead (1987), Klement *et al.* (1990) y Schaad (2001).

Pruebas	Resultado esperado
Producción de pigmento fluorescente	—
Inclusiones de poli-β-hidroxibutirato	+
Prueba de la oxidación/fermentación (O/F)	O+/F—
Actividad de catalasa	+
Prueba de oxidasa de Kovac	+
Reducción de los nitratos	+
Utilización de citratos	+
Crecimiento a 40 °C	—
Crecimiento en NaCl al 1 %	+
Crecimiento en NaCl al 2 %	—
Actividad de dihidrolasa de arginina	—
Licuefacción de la gelatina	—
Hidrólisis del almidón	—
Hidrólisis de la esculina	—
Producción de levano	—

2. Prueba IF

- 2.1. Preparar una suspensión de aproximadamente 10^6 células por ml en tampón IF (apéndice 4).
- 2.2. Preparar una serie de diluciones a 1/2 de un antisuero adecuado (véase el sitio web: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).
- 2.3. Aplicar el procedimiento IF (sección VI.A.5).
- 2.4. La prueba IF será positiva si el título IF del cultivo es equivalente al del control positivo.

3. Prueba ELISA

Nota: Si solamente se efectúan dos pruebas de identificación, no debe utilizarse ninguna otra prueba serológica además de este método.

- 3.1. Preparar una suspensión de aproximadamente 10^8 células por ml en 1X PBS (apéndice 4).
- 3.2. Llevar a cabo un procedimiento ELISA adecuado con un anticuerpo monoclonal específico de *R. solanacearum*.
- 3.3. La prueba ELISA será positiva si la lectura ELISA obtenida del cultivo es como mínimo la mitad de la obtenida para el control positivo.

4. Prueba PCR

- 4.1. Preparar una suspensión de aproximadamente 10^6 células por ml en agua estéril de grado molecular.
- 4.2. Calentar 100 µl de la suspensión celular en tubos cerrados en un calentador o al baño maría a 100 °C durante cuatro minutos. Las muestras pueden almacenarse entonces a una temperatura de -16 a -24 °C hasta que sea necesario.
- 4.3. Aplicar los procedimientos PCR adecuados para amplificar los amplicones específicos de *R. solanacearum* [por ejemplo, Seal *et al.* (1993); Pastrik y Maiss (2000); Pastrik *et al.* (2002); Boudazin *et al.* (1999); Opina *et al.* (1997); Weller *et al.* (1999)].
- 4.4. Se logrará la identificación positiva de *R. solanacearum* si los amplicones de la PCR son del mismo tamaño y tienen los mismos polimorfismos de la longitud del fragmento de restricción que los de la cepa de control positivo.

5. Prueba FISH

- 5.1. Preparar una suspensión de aproximadamente 10^6 células por ml en agua ultrapura.
- 5.2. Aplicar el procedimiento FISH (sección VI.A.7) con al menos dos oligosondas específicas para *R. solanacearum* (apéndice 7).
- 5.3. La prueba FISH será positiva si se obtienen las mismas reacciones del cultivo y el control positivo.

6. Perfiles de ácidos grasos (Fatty acid profiling o FAP)

- 6.1. Mantener el cultivo en agar de tripticasa de soja (Oxoid) durante 48 horas a 28 °C.
- 6.2. Aplicar un procedimiento FAP adecuado (Janse, 1991; Stead, 1992).
- 6.3. La prueba FAP será positiva si el perfil del presunto cultivo es idéntico al del control positivo. Los ácidos grasos cuya presencia es característica son 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH y 18:1 2OH, y la ausencia de 16:0 3OH es altamente indicativa de *Ralstonia* sp.

7. Métodos de caracterización de las cepas

Se recomienda efectuar la caracterización de las cepas con uno de los métodos siguientes para cada nuevo caso de aislamiento de *R. solanacearum*.

Cuando proceda, incluir cepas de referencia conocidas para cada prueba efectuada (véase el apéndice 3).

7.1. Determinación de los biovares

R. solanacearum se separa en biovares en función de la capacidad para utilizar y/o oxidar tres disacáridos y tres hexosas alcohólicas (Hayward, 1964 y Hayward *et al.*, 1990). Los medios nutritivos para la prueba del biovar se describen en el apéndice 2. Esta prueba puede efectuarse con éxito inoculando los medios por perforación con cultivos puros de aislados de *R. solanacearum* e incubando a 28 °C. Si los medios se distribuyen en placas estériles de cultivo de células de 96 pocillos (200 µl por pocillo) puede observarse en un plazo de 72 horas un cambio de color, del verde oliva al amarillo, lo que indica un resultado positivo de la prueba.

	Biovar				
	1	2	3	4	5
Utilización de:					
Maltosa	—	+	+	—	+
Lactosa	—	+	+	—	+
D (+) Celobiosa	—	+	+	—	+
Manitol	—	—	+	+	+
Sorbitol	—	—	+	+	—
Dulcitol	—	—	+	+	—

El biovar 2 se diferencia en subfenotipos mediante pruebas adicionales

	Biovar 2A (distribución mundial)	Biovar 2A (en Chile y Colombia)	Biovar 2T (en áreas tropicales)
Utilización de trehalosa	—	+	+
Utilización de <i>meso</i> -inositol	+	—	+
Utilización de D ribosa	—	—	+
Actividad pectolítica ⁽¹⁾	baja	baja	alta

⁽¹⁾ Véase Lelliott y Stead (1987).

7.2. Obtención de la huella dactilar genómica

La diferenciación molecular de las cepas en el complejo de *R. solanacearum* puede conseguirse mediante diferentes técnicas, entre las que se incluyen:

7.2.1. Análisis de los polimorfismos de la longitud del fragmento de restricción (RFLP) (Cook *et al.*, 1989).

7.2.2. PCR de secuencia repetitiva utilizando cebadores REP, BOX y ERIC (Louws *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995).

7.2.3. Análisis de los polimorfismos de la longitud del fragmento amplificado (AFLP) (Van der Wolf *et al.*, 1998).

7.3. Métodos PCR

Pueden utilizarse cebadores específicos de PCR (Pastrik *et al.*, 2002; véase el apéndice 6) para diferenciar cepas que pertenezcan a la división 1 (biovars 3, 4 y 5) y la división 2 (biovars 1, 2A y 2T) de *R. solanacearum*, tal como se define originalmente con el análisis RFLP (Cook *et al.*, 1989) y la secuenciación de 16S rADN (Taghavi *et al.*, 1996).

C. PRUEBA DE CONFIRMACIÓN

Como confirmación final del diagnóstico de *R. solanacearum* y para la evaluación de la virulencia de cultivos identificados como *R. solanacearum* debe realizarse la prueba de patogenicidad:

- 1) preparar un inóculo de aproximadamente 10^6 células por ml de cultivos de 24 a 48 horas a partir del aislado que se vaya a someter a prueba y una cepa de control positivo adecuada de *R. solanacearum* (por ejemplo, NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; véase el apéndice 3);
- 2) inocular entre cinco y diez tallos de plántulas de tomate o berenjena sensibles en la fase de la tercera hoja verdadera (véase la sección VI.A.9);

- 3) incubar durante un máximo de dos semanas a una temperatura de 25 a 28 °C, con humedad relativa alta y riego adecuado, evitando tanto el estancamiento del agua como el estrés provocado por la sequía. Con los cultivos puros deberá obtenerse el marchitamiento típico en el plazo de 15 días. Si después de este período no se presentan los síntomas, no podrá confirmarse que el cultivo es una forma patógena de *R. solanacearum*;
 - 4) comprobar si se aprecian síntomas de marchitamiento y/o epinastia, clorosis y crecimiento reducido;
 - 5) aislar las plantas sintomáticas separando una sección de tallo que esté 2 cm por encima del punto de inoculación. Dilacerar y suspender en un pequeño volumen de agua destilada estéril o en tampón fosfato 50 mM (apéndice 4). Aislar de la suspensión mediante dilución, extendiendo o haciendo estrías en un medio adecuado, preferentemente en un medio selectivo (apéndice 2), incubar entre 48 y 72 horas a 28 °C y examinar la formación de colonias típicas de *R. solanacearum*.
-

Apéndice 1

Laboratorios que han participado en la optimización y la validación de los protocolos

Laboratorio ⁽¹⁾	Lugar	País
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Viena y Linz	Austria
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Bélgica
Plantedirektoratet	Lyngby	Dinamarca
Central Science Laboratory	York	Inglaterra
Scottish Agricultural Science Agency	Edimburgo	Escocia
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	Francia
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Francia
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Alemania
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Alemania
State Laboratory	Dublín	Irlanda
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali	Bolonia	Italia
Regione Veneto Unità Periferica per i Servizi Fitosanitari	Verona	Italia
Nederlandse Algemene Keuringsdienst	Emmeloord	Países Bajos
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Países Bajos
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lisboa	Portugal
Centro de Diagnóstico de Aldearrubia	Salamanca	España
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias	Valencia	España
Swedish University of Agricultural Sciences	Uppsala	Suecia

⁽¹⁾ Científicos de contacto: véase el sitio web: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

Apéndice 2

Medios para el aislamiento y el cultivo de *R. solanacearum***a) Medios de cultivo en general***Agar nutritivo (NA)*

Agar nutritivo (Difco) 23,0 g

Agua destilada 1,0 l

Disolver los ingredientes y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Agar de levadura, glucosa, peptona (YPGA)

Extracto de levadura (Difco) 5,0 g

Bacto-peptona (Difco) 5,0 g

D(+)-glucosa (monohidrato) 10,0 g

Bacto-agar (Difco) 15,0 g

Agua destilada 1,0 l

Disolver los ingredientes y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Agar de sacarosa y peptona (SPA)

Sacarosa 20,0 g

Bacto-peptona (Difco) 5,0 g

K₂HPO₄ 0,5 g

MgSO₄·7H₂O 0,25 g

Bacto-agar (Difco) 15,0 g

Agua destilada 1,0 l

pH 7,2-7,4

Disolver los ingredientes y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Medio de tetrazolio de Kelman

Casaminoácidos (Difco) 1,0 g

Bacto-peptona (Difco) 10,0 g

Dextrosa 5,0 g

Bacto-agar (Difco) 15,0 g

Agua destilada 1,0 l

Disolver los ingredientes y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Enfriar a 50 °C y añadir una solución de cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (Sigma), esterilizada por filtración, para conseguir una concentración final de 50 mg/l.

b) Medios de cultivo selectivo validados

Medio SMSA (Englebrecht, 1994, modificado por Elphinstone et al., 1996)

Medio de base

Casaminoácidos (Difco) 1,0 g

Bacto-peptona (Difco) 10,0 g

Glicerol 5,0 ml

Bacto-agar (Difco) (véase la nota 2) 15,0 g

Agua destilada 1,0 l

Disolver los ingredientes y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Enfriar a 50 °C y añadir soluciones estándar acuosas, esterilizadas por filtración, de los siguientes ingredientes, a fin de obtener las concentraciones finales especificadas:

Violeta cristal (Sigma)	5 mg por l
Polimixina-B-Sulfato	(Sigma P-1004) 600 000 U (aproximadamente 100 mg) por l
Bacitracina (Sigma B-0125)	1 250 U (aproximadamente 25 mg) por l
Cloranfenicol (Sigma C-3175)	5 mg por l
Penicilina-G (Sigma P-3032)	825 U (aproximadamente 0,5 mg) por l
Cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (Sigma)	50 mg por l

Nota:

1. La utilización de reactivos diferentes de los especificados arriba puede afectar al crecimiento de *R. solanacearum*.
2. Puede utilizarse Agar oxidoide #1 en lugar de Bacto-agar (Difco). En este caso, el crecimiento de *R. solanacearum* será más lento, aunque también puede reducirse el crecimiento de saprofitas competidoras. Las colonias típicas de *R. solanacearum* pueden necesitar de uno a dos días más para formarse y la coloración rojiza puede ser más ligera y difusa que en Bacto-agar.
3. Si se incrementa la concentración de bacitracina a 2 500 U por l pueden reducirse las poblaciones de bacterias competidoras sin que se vea afectado el crecimiento de *R. solanacearum*.

Almacenar los medios y las soluciones estándar de antibióticos a 4 °C en la oscuridad y utilizar en el plazo de un mes.

Las placas deberán carecer de condensación de superficie antes de su utilización.

Evitar un secado excesivo de las placas.

Deberá efectuarse un control de calidad tras la preparación de cada nuevo lote de medio mediante siembra de una suspensión de un cultivo de referencia de *R. solanacearum* (véase el apéndice 3) y observación de la formación de colonias típicas después de incubación a 28 °C de dos a cinco días.

c) Medios de enriquecimiento validados

Caldo SMSA (Elphinstone et al., 1996)

Preparar como para medio de agar selectivo SMSA pero omitir Bacto-agar y cloruro de 2,3,5-tetrazolio.

Caldo Wilbrink modificado (Caruso et al., 2002)

Sacarosa	10 g
Peptona proteosa	5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,25 g
NaNO ₃	0,25 g
Agua destilada	1 l

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos y enfriar a 50 °C.

Añadir soluciones estándar de antibióticos como para el caldo SMSA.

Apéndice 3

A. Material de control normalizado comercialmente disponible

a) Aislados bacterianos

Se recomiendan los siguientes aislados bacterianos para su utilización como material normalizado de referencia, bien como controles positivos (cuadro 1) o durante la optimización de las pruebas para evitar reacciones cruzadas (cuadro 2). Todas las cepas están comercializadas por:

1. National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPBP), Central Science Laboratory, York, Reino Unido.
2. Culture Collection of the Plant Protection Service (PD), Wageningen, Países Bajos.
3. Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP) — INRA Station Phytobactériologie, Angers, Francia.

Cuadro 1. Panel de referencia SMT de aislados de *R. solanacearum*

Código NCPBP	SMT #	Otros códigos	País de origen	Biovar
NCPBP 4153	6	CFBP 4582, Pr 3020, EURS11	Egipto	2
NCPBP 4154	10	CFBP 4585, 550, EURS21	Turquía	2
NCPBP 3857	12	CFBP 4587, Pr 1140, EURS26	Inglaterra	2
NCPBP 1584	23	CFBP 4598, EURS49	Chipre	2
NCPBP 2505	24	CFBP 4599, EURS50	Suecia	2
NCPBP 4155	26	CFBP 4601, 502, EURS55	Bélgica	2
NCPBP 4156 (*)	71 (*)	PD 2762, CFBP 3857	Países Bajos	2
NCPBP 4157	66	LNPV 15.59	Francia	2
NCPBP 4158	39	CFBP 4608, Port 448, EURS80, NCPBP 4066	Portugal	2
NCPBP 4160	69	IVIA-1632-2	España	2
NCPBP 4161	76	B3B	Alemania	2
NCPBP 325	41	CFBP 2047, KEL60-1, R842	Estados Unidos	1
NCPBP 3967	42	CFBP 4610, R285, GONG7	Costa Rica	1
NCPBP 4028	43	CFBP 4611, R303/571, CIP310, SEQ205	Colombia	2
NCPBP 3985	44	CFBP 4612, R578, CIP312	Perú	2T
NCPBP 3989	45	CFBP 4613, R568, CIP226	Brasil	2T
NCPBP 3996	46	CFBP 3928, R276/355, CIP72, SEQ225	Perú	3
NCPBP 3997	47	CFBP 4614, R280/363, CIP49, HAY0131a	Australia	3
NCPBP 4029	48	CFBP 4615, R297/349, CIP121, CM1b2861	Sri Lanka	4
NCPBP 4005	49	CFBP 4616, R470	Filipinas	4
NCPBP 4011	50	CFBP 4617, R288, HEMPS2	China	5

(*) Utilizar como cepa normalizada de referencia de *R. solanacearum* biovar 2 (raza 3).

Nota: La autenticidad de las cepas mencionadas solamente puede garantizarse si se ha recogido de un auténtico cultivo.

Cuadro 2. Panel de referencia SMT de bacterias serológica o genéticamente relacionadas para su utilización en la optimización de las pruebas de detección

Código NCPPB	SMT #	Otro código	Identificación
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 1 696a	<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⁾ Cepa que puede presentar reacción cruzada en pruebas serológicas (IF y/o ELISA) con antisueros policlonales.

⁽²⁾ Cepa de la que puede amplificarse el producto de la PCR en algunos laboratorios de un tamaño similar al esperado utilizando cebadores específicos OLI-1 y Y-2 (véase el apéndice 6).

⁽³⁾ Probablemente tendrá reacciones cruzadas en la mayor parte de las pruebas, pero solamente se conoce su aparición en bananas en Indonesia.

b) Material de control normalizado comercialmente disponible

El siguiente material de control normalizado puede obtenerse a partir de un cultivo NCPPB:

Congelar precipitado seco de extracto de patata a partir de 200 tubérculos de patata sanos como control negativo para todas las pruebas.

Congelar precipitado seco de extracto de patata a partir de 200 tubérculos de patata sanos que contengan de 10^3 a 10^4 y 10^4 a 10^6 células de *R. solanacearum* biovar 2 (por ejemplo, cepa NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) como controles positivos para pruebas serológicas y PCR. Teniendo en cuenta que la viabilidad de las células se ve afectada durante la criodsecación, no son adecuados como controles normalizados para pruebas de aislamiento o de bioensayo.

Utilizar suspensiones fijadas con formalina de *R. solanacearum* biovar 2 (cepa NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) de 10^6 células por ml como controles positivos para pruebas serológicas.

B. Preparación de controles positivos y negativos

Preparar un cultivo de 48 horas de una cepa virulenta de *R. solanacearum* raza 3/biovar 2 (por ejemplo, cepa NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) en medio base SMSA y suspender en tampón fosfato 10 mM para obtener una densidad celular de aproximadamente 2×10^8 cfu por ml. Esto se obtiene normalmente mediante una suspensión ligeramente turbia equivalente a una densidad óptica de 0,15 a 600 nm.

Separar las cuñas basales de 200 tubérculos de una variedad de piel blanca conocida por estar exenta de *R. solanacearum*.

Procesar las cuñas basales como es habitual y resuspender el precipitado en 10 ml.

Preparar diez microviales estériles de 1,5 ml con 900 µl del precipitado resuspendido.

Transferir 100 µl de la suspensión de *R. solanacearum* al primer microvial. Homogeneizar por agitación.

Establecer niveles decimales de contaminación realizando nuevas diluciones en los cinco microviales siguientes.

Los seis microviales contaminados se utilizarán como controles positivos. Los cuatro microviales no contaminados se utilizarán como controles negativos. Etiquetar los microviales como corresponda.

Preparar alícuotas de 100 µl en microviales estériles de 1,5 ml para obtener de este modo nueve réplicas de cada muestra de control. Almacenar a una temperatura de -16 a -24 °C hasta que se vayan a utilizar.

La presencia y la cuantificación de *R. solanacearum* en las muestras de control deberá confirmarse en primer lugar mediante una prueba IF.

Para la prueba PCR, extraer ADN de las muestras de control positivas y negativas para cada serie de muestras de ensayo.

Para las pruebas IF y FISH, realizar ensayos con las muestras de control positivas y negativas para cada serie de muestras de ensayo.

En las pruebas IF, FISH y PCR, debe detectarse *R. solanacearum* en al menos 10^6 y 10^4 células/ml de los controles positivos y en ninguno de los controles negativos.

Apéndice 4

Tampones para procedimientos de ensayo

GENERAL: Los tampones esterilizados que no se hayan abierto pueden almacenarse hasta un año.

1. Tampones para el procedimiento de extracción

1.1. Tampón de extracción (tampón fosfato 50 mM, pH 7,0)

Este tampón se utiliza para la extracción de la bacteria del tejido de las plantas mediante la homogeneización o la agitación.

Na ₂ HPO ₄ (anhidro)	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
Agua destilada	1,00 l

Disolver los ingredientes, verificar el pH y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Los siguientes componentes adicionales pueden resultar útiles:

	Finalidad	Cantidad (por l)
Copos de Lubrol	Defloculante (*)	0,5 g
Compuesto DC silicona antiespumante	Antiespumante (*)	1,0 ml
Pirofosfato tetrasódico	Antioxidante	1,0 g
Polivinilpirrolidona-40000 (PVP-40)	Unir los inhibidores PCR	50 g

(*) Para su utilización en el método de extracción por homogeneización.

1.2. Tampón de precipitado (tampón fosfato 10 mM, pH 7,2)

Este tampón se utiliza para la resuspensión y la dilución de extractos de cuñas basales de tubérculos de patata tras la concentración en un precipitado mediante centrifugación.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,4 g
Agua destilada	1,0 l

Disolver los ingredientes, verificar el pH y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

2. Tampones para la prueba IF

2.1. Tampón IF [tampón fosfato salino (PBS) 10 mM, pH 7,2]

Este tampón se utiliza para la dilución de anticuerpos.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,4 g
NaCl	8,0 g
Agua destilada	1,0 l

Disolver los ingredientes, verificar el pH y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

2.2. Tampón IF-Tween

Este tampón se utiliza para lavar los portaobjetos.

Añadir 0,1 % de Tween 20 al tampón IF.

2.3. Solución de glicerol con tampón de fosfato, pH 7,6

Este tampón se utiliza como fluido de montaje en los pocillos de los portaobjetos de IF para aumentar la fluorescencia.

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

En el mercado pueden encontrarse soluciones de montaje que protegen la fluorescencia, como, por ejemplo, Vectashield® (Vector Laboratories) o Citifluor® (Leica).

3. Tampones para la prueba ELISA indirecta

3.1. Tampón fuerza doble para tapizado, pH 9,6

Na_2CO_3	6,36 g
NaHCO_3	11,72 g
Agua destilada	1,00 l

Disolver los ingredientes, verificar el pH y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Puede añadirse como antioxidante sulfito de sodio (0,2 %) si es necesario para evitar la acumulación de compuestos aromáticos oxidados.

3.2. 10X Tampón fosfato salino (PBS), 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
Agua destilada	1,0 l

3.3. PBS-Tween

10X PBS	100 ml
10 % Tween 20	5 ml
Agua destilada	895 ml

3.4. Tampón de bloqueo (anticuerpos) (debe prepararse en el momento de su utilización)

10X PBS	10,0 ml
Polivinilpirrolidona-44000 (PVP-44)	2,0 g
10 % Tween 20	0,5 ml
Leche en polvo	0,5 g
Agua destilada	completar hasta 100 ml

3.5. Solución de sustrato fosfatasa alcalina, pH 9,8

Dietanolamina	97 ml
Agua destilada	800 ml

Mezclar y ajustar el pH a 9,8 con HCl concentrado.

Completar hasta 1 litro con agua destilada.

Añadir 0,2 g de MgCl_2 .

Disolver dos pastillas de 5 mg de sustrato fosfatasa (Sigma) por cada 15 ml de solución.

4. **Tampones para la prueba DASI ELISA**

4.1. Tampón de tapizado, pH 9,6

Na_2CO_3	1,59 g
NaHCO_3	2,93 g
Agua destilada	1 000 ml

Disolver los ingredientes y comprobar el pH.

4.2. 10X Tampón fosfato salino (PBS), pH 7,2-7,4

NaCl	80,0 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,0 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	27,0 g
Agua destilada	1 000 ml

4.3. PBS-Tween

10X PBS	50 ml
10 % Tween 20	5 ml
Agua destilada	950 ml

4.4. Tampón de sustrato, pH 9,8

Dietanolamina	100 ml
Agua destilada	900 ml

Mezclar y ajustar el pH a 9,8 con HCl concentrado.

Apéndice 5

Determinación del nivel de contaminación en las pruebas IF y FISH

1. Contar el número medio de células fluorescentes típicas por campo de visión (c).
2. Calcular el número de células fluorescentes típicas por pocillo del portaobjetos del microscopio (C):

$$C = c \times S/sd$$

onde S = superficie del pocillo del portaobjetos múltiple

y s = superficie del campo del objetivo

$$s = \pi^2/4G^2K^2 \quad \text{donde } i = \text{coeficiente de campo (varía de 8 a 24 dependiendo del tipo ocular)}$$

K = coeficiente del tubo (1 o 1,25)

G = aumentos del objetivo (100x, 40x, etc.)

3. Calcular el número de células fluorescentes típicas por ml de precipitado resuspendido (N):

$$N = C \times 1\,000/y \times F$$

onde y = volumen de precipitado resuspendido en cada pocillo

y F = factor de dilución del precipitado resuspendido

Apéndice 6

Protocolos y reactivos PCR validados

Nota: Las pruebas preliminares deberán permitir la detección reproducible de al menos 10^3 a 10^4 células de *R. solanacearum* por ml de extracto de muestra.

Por otra parte, las pruebas preliminares no deben arrojar resultados positivos falsos con respecto a un conjunto de cepas bacterianas seleccionadas (véase el apéndice 3).

1. Protocolo PCR de Seal *et al.* (1993)

1.1. Cebadores del oligonucleótido

Cebador directo OLI-1 5'-GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC-3'

Cebador reverso Y-2 5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'

Tamaño esperado del amplicón de los moldes de ADN de *R. solanacearum* = 288 bp.

1.2. Mezcla para la reacción PCR

Reactivo	Cantidad por reacción	Concentración final
Agua ultrapura estéril	17,65 µl	
10x tampón PCR ⁽¹⁾ (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1x (1,5 mM MgCl ₂)
Mezcla dNTP (20 mM)	0,25 µl	0,2 mM
Cebador OLI-1 (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Cebador Y-2 (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Polimerasa Taq (5 U/µl) ⁽¹⁾	0,1 µl	0,5 U
Volumen de muestra	2,0 µl	
Volumen total	25 µl	

⁽¹⁾ El método se validó utilizando polimerasa Taq de Perkin Elmer (AmpliTaq) y Gibco BRL.

1.3. Condiciones de reacción PCR

Aplicar el siguiente programa:

- 1 ciclo de: i) 2 minutos a 96 °C (desnaturalización del molde de ADN)
- 35 ciclos de: ii) 20 segundos a 94 °C (desnaturalización del molde de ADN)
- iii) 20 segundos a 68 °C (hibridación de los cebadores)
- iv) 30 segundos a 72 °C (extensión de la copia)
- 1 ciclo de: v) 10 minutos a 72 °C (extensión final)
- vi) mantener a 4 °C.

Nota: Este programa se optimizó para utilizarlo con un termociclador Perkin Elmer 9600. Puede ser preciso modificar la duración de los ciclos ii), iii) y iv) para su utilización con otros modelos.

1.4. Análisis de la enzima de restricción del amplicón

Los productos PCR amplificados a partir de ADN de *R. solanacearum* producen un polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción característico con la enzima Ava II tras la incubación a 37 °C.

2. Protocolo PCR de Pastrik y Maiss (2000)

2.1. Cebadores del oligonucleótido

Cebador directo Ps-1 5'- agt cga acg gca gcg ggg g -3'

Cebador reverso Ps-2 5'- ggg gat ttc aca tcg gtc ttg ca -3'

Tamaño esperado del amplicón de los moldes de ADN de *R. solanacearum* = 553 bp.

2.2. Mezcla para la reacción PCR

Reactivo	Cantidad por reacción	Concentración final
Agua ultrapura estéril	16,025 µl	
10x tampón PCR (1)	2,5 µl	1x (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (fracción V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
Mezcla d-nTP (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Cebador Ps-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Cebador Ps-2 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Polimerasa Taq (5 U/µl) (1)	0,1 µl	0,5 U
Volumen de muestra	5,0 µl	
Volumen total	25,0 µl	

(1) Los métodos se validaron utilizando polimerasa Taq de Perkin Elmer (AmpliTaq) y Gibco BRL.

Nota: Originalmente optimizado para termociclador MJ Research PTC 200 con polimerasa Gibco Taq.

También pueden utilizarse Perkin Elmer AmpliTaq y tampón con las mismas concentraciones.

2.3. Condiciones de reacción PCR

Aplicar el siguiente programa:

- 1 ciclo de: i) 5 minutos a 95 °C (desnaturalización del molde de ADN)
- 35 ciclos de: ii) 30 segundos a 95 °C (desnaturalización del molde de ADN)
- iii) 30 segundos a 68 °C (hibridación de los cebadores)
- iv) 45 segundos a 72 °C (extensión de la copia)
- 1 ciclo de: v) 5 minutos a 72 °C (extensión final)
- vi) mantener a 4 °C.

Nota: Este programa está optimizado para utilizarlo con un termociclador MJ Research PTC 200. Puede ser preciso modificar la duración de los ciclos ii), iii) y iv) para su utilización con otros modelos.

2.4. Análisis de la enzima de restricción del amplicón

Los productos PCR amplificados a partir de ADN de *R. solanacearum* producen un polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción característico con la enzima Taq I tras la incubación a 65 °C durante 30 minutos. Los fragmentos de restricción obtenidos a partir del fragmento específico de *R. solanacearum* tienen un tamaño de 457 bp y 96 bp.

3. Protocolo PCR multiplex con control PCR interno (Pastrik et al., 2002)

3.1. Cebadores del oligonucleótido

Cebador directo RS-1-F 5'- ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA -3'

Cebador reverso RS-1-R 5'- CCC AGT CAC GGC AGA GAC T -3'

Cebador directo NS-5-F 5'- AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G -3'

Cebador reverso NS-6-R 5'- GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC -3'

Tamaño esperado del amplicón de los moldes de ADN de *R. solanacearum* = 718 bp (conjunto de cebadores RS).

Tamaño esperado del amplicón de control PCR interno 18S rARN = 310 bp (conjunto de cebadores NS).

3.2. Mezcla para la reacción PCR

Reactivo	Cantidad por reacción	Concentración final
Agua ultrapura estéril	12,625 µl	
10x tampón PCR ⁽¹⁾ (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1x (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (fracción V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
Mezcla d-nTP (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Cebador RS-1-F (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Cebador RS-1-R (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Cebador NS-5-F (10 µM) ⁽²⁾	0,15 µl	0,06 µM
Cebador NS-6-R (10 µM) ⁽²⁾	0,15 µl	0,06 µM
Polimerasa Taq (5 U/µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1,0 U
Volumen de muestra	5,0 µl	
Volumen total	25,0 µl	

⁽¹⁾ Los métodos se validaron utilizando polimerasa Taq de Perkin Elmer (AmpliTaq) y Gibco BRL.

⁽²⁾ La concentración de los cebadores NS-5-F y NS-6-R se optimizó para la extracción de cuñas basales de patata utilizando el método de homogeneización y purificación del ADN de acuerdo con Pastrik (2000) (véase la sección VI.A.6.1.a). Será necesario proceder a la reoptimización de las concentraciones de reactivos si se utilizan la extracción por agitación u otros métodos de aislamiento del ADN.

3.3. Condiciones de reacción PCR

Aplicar el siguiente programa:

- 1 ciclo de: i) 5 minutos a 95 °C (desnaturalización del molde de ADN)
- 35 ciclos de: ii) 30 segundos a 95 °C (desnaturalización del molde de ADN)
- iii) 30 segundos a 58 °C (hibridación de los cebadores)
- iv) 45 segundos a 72 °C (extensión de la copia)
- 1 ciclo de: v) 5 minutos a 72 °C (extensión final)
- vi) mantener a 4 °C.

Nota: Este programa está optimizado para utilizarlo con un termociclador MJ Research PTC 200. Puede ser preciso modificar la duración de los ciclos ii), iii) y iv) para su utilización con otros modelos.

3.4. Análisis de la enzima de restricción del amplicón

Los productos PCR amplificados a partir de ADN de *R. solanacearum* producen un polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción característico con la enzima *Bsm I* o un *Isoschizomere* (por ejemplo, *Mva I* 1269 I) tras la incubación a 65 °C durante 30 minutos.

4. Protocolo PCR específico del biovar de *R. solanacearum* (Pastrik et al, 2001)

4.1. Cebadores del oligonucleótido

Cebador directo Rs-1-F 5'- ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA -3'

Cebador reverso Rs-1-R 5'- CCC AGT CAC GGC AGA GAC T -3'

Cebador reverso Rs-3-R 5'- TTC ACG GCA AGA TCG CTC -3'

Tamaño esperado del amplicón de los moldes de ADN de *R. solanacearum*:

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

con Rs-1-F/Rs-3-R = 716 bp.

4.2. Mezcla para la reacción PCR

a) Biovar 1/2 específico PCR

Reactivo	Cantidad por reacción	Concentración final
Agua ultrapura estéril	12,925 µl	1x (1,5 mM MgCl ₂)
10X tampón PCR ⁽¹⁾	2,5 µl	
BSA (fracción V) (10 %)	0,25 µl	
Mezcla dNTP (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Cebador Rs-1-F (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Cebador Rs-1-R (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Polimerasa Taq (5 U/µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1 U
Volumen de muestra	5,0 µl	
Volumen total	25,0 µl	

⁽¹⁾ Los métodos se validaron utilizando polimerasa Taq de Perkin Elmer (AmpliTaq) y Gibco BRL.

b) Biovar 3/4/5 específico PCR

Reactivo	Cantidad por reacción	Concentración final
Agua ultrapura estéril	14,925 µl	1x (1,5 mM MgCl ₂)
10X tampón PCR ⁽¹⁾	2,5 µl	
BSA (fracción V) (10 %)	0,25 µl	
Mezcla dNTP (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Cebador Rs-1-F (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Cebador Rs-3-R (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Polimerasa Taq (5 U/µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1 U
Volumen de muestra	5,0 µl	
Volumen total	25,0 µl	

⁽¹⁾ Los métodos se validaron utilizando polimerasa Taq de Perkin Elmer (AmpliTaq) y Gibco BRL.

4.3. Condiciones de reacción PCR

Aplicar el siguiente programa a las reacciones específicas de biovar 1/2 y biovar 3/4/5:

- 1 ciclo de: i) 5 minutos a 95 °C (desnaturalización del molde de ADN)
- 35 ciclos de: ii) 30 segundos a 95 °C (desnaturalización del molde de ADN)
- iii) 30 segundos a 58 °C (hibridación de los cebadores)
- iv) 45 segundos a 72 °C (extensión de la copia)
- 1 ciclo de: v) 5 minutos a 72 °C (extensión final)
- vi) mantener a 4 °C.

Nota: Este programa se optimizó para utilizarlo con un termociclador MJ Research PTC 200. Puede ser preciso modificar la duración de los ciclos ii), iii) y iv) para su utilización con otros modelos.

4.4. Análisis de la enzima de restricción del amplicón

Los productos PCR amplificados a partir de ADN de *R. solanacearum* utilizando cebadores Rs-1-F y Rs-1-R producen un polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción característico con la enzima *Bsm I* o un *Isoschizomere* (por ejemplo, *Mva I* 1269 I) tras la incubación a 65 °C durante 30 minutos. Los productos PCR amplificados a partir de ADN de *R. solanacearum* utilizando los cebadores Rs-1-F y Rs-3-R no poseen sitios de restricción.

5. Preparación del tampón de carga**5.1. Azul de bromofenol (solución estándar al 10 %)**

Azul de bromofenol	5 g
Agua destilada (bideist)	50 ml

5.2. Tampón de carga

Glicerol (86 %)	3,5 ml
Azul de bromofenol (5,1)	300 µl
Agua destilada (bideist)	6,2 ml

6. 10X tampón de tris acetato EDTA (TAE), pH 8,0

Tampón tris	48,40 g
Ácido acético glacial	11,42 ml
EDTA (sal disódica)	3,72 g
Agua destilada	1,00 l

Diluir a 1X antes de utilizarlo.

Se encuentra también disponible en el mercado (por ejemplo, Invitrogen o equivalente).

Apéndice 7

Reactivos validados para la prueba FISH

1. Oligosondas

Sonda específica para *R. solanacearum* OLI-1-CY3: 5'- GGC AGG TAG CAA GCT ACC CCC-3'

Sonda eubacteriana no específica EUB-338-FITC: 5'- GCT GCC TCC CGT AGG AGT -3'

2. Solución fijadora

¡ADVERTENCIA! LA SOLUCIÓN FIJADORA CONTIENE PARAFORMALDEHÍDO QUE ES TÓXICO. UTILIZAR GUANTES Y NO INHALAR. SE RECOMIENDA TRABAJAR EN UNA CAMPANA EXTRACTORA DE GASES.

- i) Calentar 9 ml de agua de grado molecular, por ejemplo agua ultrapura, a 60 °C aproximadamente y añadir 0,4 g de paraformaldehído. El paraformaldehído se disuelve cuando se añaden 5 gotas de 1N NaOH y se remueve con un agitador magnético.
- ii) Ajustar el pH a 7,0 mediante la adición de 1 ml de tampón de fosfato de concentración 0,01 M y 5 gotas de 1N HCl. Verificar el pH con bandas indicadoras y ajustar si fuese necesario con HCl o NaOH. *¡ADVERTENCIA! NO UTILIZAR UN MEDIDOR DE PH EN SOLUCIONES QUE CONTENGAN PARAFORMALDEHÍDO.*
- iii) Filtrar la solución con un filtro de membrana de 0,22 µm y mantener libre de polvo a 4 °C hasta nueva utilización.

3. 3X Hybmix

NaCl	2,7 M
Tris-HCl	60 mM (pH 7,4)
EDTA (filtro esterilizado con autoclave)	15 mM

Diluir a 1X como se precisa.

4. Solución de hibridación

1X Hybmix	
Dodecilsulfato sódico (SDS)	0,01 %
Formamida	30 %
Sonda EUB 338	5 ng/µl
Sonda OLI-1 o OLI-2	5 ng/µl

Preparar las cantidades de solución de hibridación de acuerdo con los cálculos del cuadro. Para cada portaobjetos (que contenga dos muestras distintas por duplicado) se precisan 90 µl de solución de hibridación. *IMPORTANTE: DEBE TENERSE EN CUENTA QUE LA FORMAMIDA ES MUY TÓXICA, POR LO QUE DEBEN UTILIZARSE GUANTES Y TOMARSE LAS PRECAUCIONES DE SEGURIDAD NECESARIAS.*

Cuadro Cantidades sugeridas para la preparación de la mezcla de hibridación

Número de portaobjetos	1	4	6	8	10
Agua ultrapura estéril	23,1	92,4	138,6	184,8	231,0
3X hybmix	30,0	120,0	180,0	240,0	300,0
1 % SDS	0,9	3,6	5,4	7,2	9,0
Formamida	27,0	108,0	162,0	216,0	270,0
Sonda EUB 338 (100 ng/µl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Sonda OLI-1 u OLI-2 (100 ng/µl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Volumen total (µl)	90,0	360,0	540,0	720,0	900,0

Nota: Almacenar todas las soluciones que contengan oligosondas fotosensibles en la oscuridad a - 20 °C.
Proteger de la luz del sol o eléctrica directa durante su utilización.

5. Tampón fosfato 0,1 M, pH 7,0

Na_2HPO_4	8,52 g
KH_2PO_4	5,44 g
Agua destilada	1,00 l

Disolver los ingredientes, verificar el pH y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Apéndice 8

Condiciones de cultivo para el tomate y la berenjena

Sembrar semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) o berenjena (*Solanum melongena*) en compost pasteurizado de semillas. Trasplantar las plántulas con los cotiledones completamente abiertos (10 a 14 días) en compost pasteurizado de tiesto.

Las berenjenas o los tomates deben cultivarse en un invernadero que cumpla las siguientes condiciones medioambientales antes de la inoculación:

Duración diurna: 14 horas o día natural si es de mayor duración

Temperatura: diurna: 21 a 24 °C
nocturna: 14 a 18 °C

Variedad de tomate sensible: "Moneymaker"

Variedad de berenjena sensible: "Black Beauty"

Proveedores: véase el sitio web: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

REFERENCIAS

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 Phyto bacteriology*. 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). *Klewer 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. Taverne, 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. Pastrok, K.H. and Maiss, E. 2000. Detection of *R. solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. *J. Phytopathology* 148; 619-626.
21. Pastrok, 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., Trigallet, 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.
-

ANEXO III

1. En cada caso de brote sospechoso para el que se haya realizado una o varias pruebas de selección con resultados positivos de acuerdo con los métodos establecidos en el anexo II para el material vegetal enumerado y para todos los otros casos, y se espere recibir confirmación o refutación por aplicación de los citados métodos, se deberá proceder a la retención y adecuada conservación, hasta completar los métodos mencionados, de:
 - todos los tubérculos de los que se hayan obtenido muestras y, siempre que sea posible, todas las plantas de las que se hayan obtenido muestras,
 - cualquier extracto sobrante y cualquier material adicional que se haya preparado para la prueba o pruebas de selección, como por ejemplo placas de inmunofluorescencia,
 - y
 - toda la documentación pertinente.

La retención de los tubérculos permitirá que se puedan llevar a cabo pruebas de variedades cuando se estime oportuno.
2. En el caso de confirmación de la presencia del organismo, se procederá a la retención y adecuada conservación hasta un mes después, como mínimo, en virtud del procedimiento establecido en el artículo 5, apartado 2:
 - del material especificado en el punto 1,
 - y
 - de una muestra de las berenjenas o los tomates infectados inoculados con extracto de tubérculo o de planta, cuando sea adecuado,
 - y
 - del cultivo aislado del organismo.

ANEXO IV

Los elementos de la investigación que dispone el artículo 5, apartado 1, letra a), inciso i), serán, cuando proceda, los siguientes:

i) lugares de producción:

- en los que se estén cultivando o se hayan cultivado patatas que estén relacionadas clónicamente con aquellas en las que se haya comprobado la infección por el organismo,
- en los que se estén cultivando o se hayan cultivado tomates que procedan de las mismas fuentes que aquellos en los que se haya comprobado la infección por el organismo,
- en los que se estén cultivando o se hayan cultivado patatas o tomates que se hayan puesto bajo control oficial por sospecharse la presencia del organismo,
- en los que se estén cultivando o se hayan cultivado patatas que estén relacionadas clónicamente con las que hayan sido cultivadas en lugares de producción de los que se sospeche la infección por el organismo,
- en los que se cultiven patatas o tomates y que estén localizados en las proximidades de los lugares de producción infectados, incluidos aquellos en los que se compartan equipos e instalaciones de producción directamente o por intervención de un contratista común,
- en los que se utilicen para las labores de riego o rociamiento aguas de superficie de cualquier fuente en la que se haya confirmado o de la que se sospeche la infección por el organismo,
- en los que se utilicen para las labores de riego o rociamiento aguas de superficie de una fuente explotada en común con lugares de producción en los que se haya confirmado o de los que se sospeche la infección por el organismo,
- que estén o hayan sido anegados con aguas de superficie en las que se haya confirmado o de las que se sospeche la infección por el organismo,

y

ii) las aguas de superficie que se utilicen para el riego o rociamiento, o para la anegación, de un campo o campos o de un lugar o lugares de producción en los que se haya confirmado la infección

ANEXO V

1. Al determinar, con arreglo al artículo 5, apartado 1, letra a), inciso iii), y al artículo 5, apartado 1, letra c), inciso iii), el alcance de la contaminación probable, se incluirán los elementos siguientes:
 - el material vegetal indicado obtenido en un lugar de producción que haya sido declarado contaminado en virtud del artículo 5, apartado 1, letra a), inciso ii),
 - el lugar o lugares de producción que tengan una relación de producción con el material vegetal indicado que haya sido declarado contaminado en virtud del artículo 5, apartado 1, letra a), inciso ii), incluidos aquellos lugares que compartan equipos e instalaciones de producción directamente o por intervención de un contratista común,
 - el material vegetal indicado que se haya producido en el lugar o lugares de producción contemplados en el guión anterior o que estuviera presente en tales lugares durante el tiempo en que el material vegetal indicado declarado contaminado en virtud del artículo 5, apartado 1, letra a), inciso ii), se hallara presente en el lugar de producción mencionado en el primer guión,
 - las instalaciones que hayan manipulado el material vegetal indicado procedente de los lugares de producción a los que se refieren los guiones anteriores,
 - cualquier maquinaria, vehículo, buque, almacén o unidades de estos y cualesquiera otros objetos, incluido el material de embalaje, que puedan haber estado en contacto con el material vegetal indicado declarado contaminado en virtud del artículo 5, apartado 1, letra a), inciso ii),
 - cualquier material vegetal indicado que haya sido almacenado o haya estado en contacto con cualquiera de las estructuras y los objetos mencionados en el guión anterior antes de la limpieza y desinfección de estos,
 - como resultado de la investigación y de los análisis contemplados en el artículo 5, apartado 1, letra a), inciso i), en el caso de las patatas, aquellos tubérculos o plantas que tengan una relación clonal fraterna o parental y, en el caso del tomate, aquellas plantas que procedan de las mismas fuentes que el material vegetal indicado declarado contaminado en virtud del artículo 5, apartado 1, letra a), inciso ii), y para las cuales, aunque las pruebas de detección del organismo hayan sido negativas, parezca probable la contaminación a través de un vínculo clonal. Puede efectuarse una prueba de variedades para verificar la identidad de los tubérculos o plantas contaminados que estén relacionados clónicamente,
 - el lugar o lugares de producción del material vegetal indicado a que se refiere el guión anterior,
 - el lugar o lugares de producción del material vegetal indicado en los que se utilicen para las labores de riego o rociamiento aguas que hayan sido declaradas contaminadas en virtud del artículo 5, apartado 1, letra c), inciso ii),
 - el material vegetal indicado producido en campos anegados con aguas de superficie en las que se haya confirmado la contaminación.
2. Para la determinación de la posible propagación a la que se refieren el artículo 5, apartado 1, letra a), inciso iv), y el artículo 5, apartado 1, letra c), inciso iii), deberán tenerse en cuenta los elementos siguientes:
 - i) en los casos previstos en el artículo 5, apartado 1, letra a), inciso iv):
 - la proximidad de otros lugares de producción en los que se cultive el material vegetal indicado,
 - la producción y utilización comunes de existencias de patatas de siembra,
 - los lugares de producción en los que se utilicen aguas de superficie para el riego o rociamiento del material vegetal indicado cuando exista o haya existido el riesgo de escorrentía, o de anegamiento, de aguas superficiales procedentes de un lugar o lugares de producción que hayan sido declarados contaminados en virtud del artículo 5, apartado 1, letra a), inciso ii),

- ii) en los casos en que se hayan declarado contaminadas aguas de superficie en virtud del artículo 5, apartado 1, letra c), inciso ii):
 - el lugar o lugares productores del material vegetal indicado contiguos a las aguas superficiales declaradas contaminadas, o que corran el riesgo de ser anegados por estas aguas,
 - cualquier fuente de riego separada que se comuniquen de alguna forma con las aguas superficiales declaradas contaminadas,
 - masas de agua conectadas con el agua superficial declarada contaminada, teniendo en cuenta:
 - la dirección y el nivel de flujo del agua declarada contaminada,
 - la presencia de solanáceas silvestres huésped.
- 3. La notificación a la que se refiere el artículo 5, apartado 2, párrafo primero, deberá:
 - efectuarse de manera inmediata una vez que la presencia del organismo haya sido confirmada por las pruebas de laboratorio con arreglo a los métodos expuestos en el anexo II, y deberá recoger, como mínimo:
 - para las patatas:
 - a) el nombre de la variedad del lote,
 - b) el tipo (de consumo, de siembra, etc.) y, en su caso, la categoría de siembra,
 - para las tomateras: el nombre de la variedad del lote y, en su caso, la categoría,
 - sin perjuicio de los requisitos de notificación de la sospecha de la presencia del organismo previstos en el artículo 4, apartado 3, el Estado miembro en el que se haya confirmado la presencia del organismo, cuando exista un riesgo de contaminación del material vegetal indicado desde o hacia otro Estado o Estados miembros, transmitirá inmediatamente al Estado o los Estados miembros afectados la información necesaria para cumplir el artículo 5, apartado 3, que incluye:
 - a) el nombre de la variedad del lote de patatas o tomates,
 - b) el nombre y la dirección del expedidor y del destinatario,
 - c) la fecha de entrega del lote de patatas o tomates,
 - d) el tamaño del lote de patatas o tomates entregado,
 - e) una copia del pasaporte fitosanitario o, como mínimo, de su número, cuando sea apropiado o, en su caso, el número de registro del productor o comerciante y una copia del aviso de entrega.

Deberá notificarse inmediatamente a la Comisión una vez se haya transmitido la información mencionada.
- 4. La notificación adicional a la que se refiere el artículo 5, apartado 2, párrafo segundo, deberá incluir lo siguiente: cuando hayan finalizado todas las investigaciones, y para cada caso:
 - a) la fecha en la que se confirmó la contaminación;
 - b) una breve descripción de la investigación llevada a cabo para identificar la fuente y posible propagación de la contaminación, incluido el nivel de muestreo efectuado;
 - c) información sobre la fuente o fuentes de contaminación determinadas o presuntas;
 - d) detalles relativos al alcance de la contaminación declarada, incluido el número de lugares de producción y, en el caso de las patatas, el número de lotes, con la indicación de la variedad y, en el caso de las patatas de siembra, la categoría;

- e) detalles relativos a la delimitación de la zona, incluido el número de lugares de producción no declarados contaminados pero incluidos en la zona;
 - f) detalles relativos a la designación del agua, incluido el nombre y la ubicación de la masa de agua y el alcance de la prohibición de riego/designación;
 - g) en el caso de cualquier partida o lote de tomates declarado como contaminado, los certificados prescritos en el artículo 13, apartado 1, inciso ii), de la Directiva 2000/29/CE y el número de pasaporte, de acuerdo con la lista que se recoge en el anexo V, parte A, sección I, punto 2.2, de la Directiva 2000/29/CE;
 - h) cualesquiera otros datos que requiera la Comisión relativos al brote o los brotes confirmados.
-

ANEXO VI

1. Las disposiciones mencionadas en el artículo 6, apartado 1, serán las siguientes:

- la utilización como piensos, previo tratamiento térmico adecuado, de forma que no haya riesgo alguno de supervivencia del organismo,
- o
- la eliminación en un vertedero de eliminación de residuos autorizado oficialmente en donde no exista ningún riesgo identificable de escape del organismo al medio ambiente, por ejemplo, a través de filtración a tierras agrícolas ni de contacto con fuentes de agua que puedan utilizarse para el riego de dichas tierras,
- o
- la incineración,
- o
- la transformación industrial mediante entrega directa e inmediata a una planta de transformación dotada de instalaciones de eliminación de residuos autorizadas oficialmente, para las que se establezca la ausencia de riesgos detectables de propagación del organismo, y de un sistema de limpieza y desinfección de los vehículos de transporte, al menos,
- u
- otras medidas, siempre que se descarte el posible riesgo de propagación del organismo; dichas medidas y su justificación se notificarán inmediatamente a la Comisión y a los demás Estados miembros.

Cualquier residuo restante asociado con las opciones anteriores y derivado de ellas se eliminará con métodos autorizados oficialmente de conformidad con el anexo VII de la presente Directiva.

2. El uso adecuado o la eliminación del material vegetal indicado dispuestos en el artículo 6, apartado 2, deberán efectuarse bajo el control de los organismos oficiales responsables del Estado o Estados miembros interesados, así como con la oportuna comunicación entre estos organismos para garantizar en todo momento dicho control, y con la aprobación del organismo oficial responsable del Estado miembro donde vayan a envasarse o transformarse las patatas, en lo que se refiere a los vertederos citados en los guiones primero y segundo, y consistirán en lo siguiente:

i) en el caso de los tubérculos de patata:

- la utilización como patatas de consumo destinadas al consumo, envasadas para su distribución y venta directa sin cambio de envase, en un lugar dotado de instalaciones de eliminación de residuos adecuadas. Las patatas destinadas a la siembra solo pueden manipularse en el mismo lugar si esto se realiza separadamente o tras la limpieza y desinfección,
- o
- su uso como patatas de consumo para la transformación industrial y destinadas a la entrega directa e inmediata a una planta de transformación dotada de instalaciones de eliminación de residuos adecuadas y de un sistema de limpieza y desinfección de los vehículos de transporte, al menos,
- o
- algún otro tipo de uso o eliminación, siempre que se establezca que no existe ningún riesgo identificable de propagación del organismo, y previa aprobación de los citados organismos oficiales responsables,

ii) en el caso de las otras partes de las plantas, incluidos los detritos del tallo y de las hojas,

- la destrucción,
- o
- cualquier otro uso o eliminación, a condición de que se garantice que no existe riesgo identificable de dispersar el organismo, y previa aprobación de los citados organismos oficiales responsables.

3. Los métodos adecuados para la descontaminación de los objetos a los que se refiere el artículo 6, apartado 3, consistirán en una limpieza y, en su caso, una desinfección que permitan descartar todo riesgo identificable de propagación del organismo; estas operaciones se efectuarán bajo la supervisión de los organismos oficiales responsables de los Estados miembros.
4. La serie de medidas mencionadas en el artículo 6, apartado 4, que deberán aplicar los Estados miembros dentro de la zona o zonas delimitadas que se hayan establecido en virtud del artículo 5, apartado 1, letra a), inciso iv), y del artículo 5, apartado 1, letra c), inciso iii), serán las siguientes:
 - 4.1. En los casos en que, en virtud del artículo 5, apartado 1, letra a), inciso ii), se hayan declarado contaminados lugares de producción, las medidas consistirán en lo siguiente:
 - a) en los campos o unidades de producción de cultivos protegidos que se hayan declarado contaminados en virtud de esa misma disposición:
 - i) durante al menos los cuatro años de cultivo siguientes a la declaración de la contaminación:
 - se adoptarán medidas para eliminar las patatas y tomates espontáneas así como otras plantas que puedan ser huésped del organismo, incluidas las malas hierbas solanáceas,
 - y
 - no se plantarán:
 - tubérculos, plantas ni semillas propiamente dichas de patata,
 - tomates y semillas de tomates,
 - teniendo en cuenta la biología del organismo:
 - otras plantas huésped,
 - plantas de especies de *Brassica* para las que exista un riesgo identificado de supervivencia del organismo,
 - otros cultivos para los que exista un riesgo identificado de propagación del organismo,
 - en la primera temporada de cultivo de patatas o tomates siguiente al período indicado en el guión anterior, y siempre que se haya comprobado que, durante al menos los dos años de vegetación inmediatamente anteriores a la plantación, el campo estuvo libre de patatas y tomates espontáneas y de otras plantas huésped del organismo, incluidas las malas hierbas solanáceas:
 - en el caso de las patatas, solamente se autorizará la producción de patatas de consumo,
 - en el caso de las patatas y los tomates, los tubérculos de patata cosechados, o las tomates, según corresponda, serán analizados de conformidad con el procedimiento detallado en el anexo II,
 - en la temporada de cultivo de patatas o tomates siguiente a la indicada en el guión anterior y tras un ciclo de rotación adecuado, que será de un mínimo de dos años si se cultivan patatas de siembra, se efectuará un examen oficial tal como se dispone el artículo 2, apartado 1,
 - o
 - ii) durante los cinco años de cultivo siguientes al de la declaración de la contaminación:
 - se adoptarán medidas para eliminar las patatas y tomates espontáneas así como otras plantas que puedan contener naturalmente el organismo, incluidas las malas hierbas solanáceas,
 - y
 - durante los tres primeros años, se dejará y mantendrá el campo, bien en barbecho completo, bien para el cultivo de cereales, con arreglo al riesgo que se haya determinado, bien como pasto permanente, con siega intensa y frecuente o pastoreo intensivo, o bien como pastizal para la producción de semillas y, a continuación, en los dos años subsiguientes, se plantarán plantas que no sean huésped del organismo para las que no exista ningún riesgo identificado de supervivencia o propagación de este,

- en la primera temporada de cultivo de patatas o tomates siguiente al período indicado en el guión anterior y, siempre que se haya comprobado que, durante al menos los dos años de vegetación inmediatamente anteriores a la plantación, el campo estuvo libre de patatas y tomates espontáneos y de otras plantas huésped del organismo, incluidas las malas hierbas solanáceas:
 - en el caso de las patatas, se autorizará la producción de patatas de siembra y de consumo,
 - los tubérculos de patata cosechados, o las tomates, según corresponda, serán analizados de conformidad con el procedimiento detallado en el anexo II;
- b) en el resto de los campos del lugar de producción contaminado y a condición de que los organismos oficiales competentes tengan la certeza de que se ha eliminado adecuadamente el riesgo de plantas de patata y de tomate espontáneos y de cualquier otra planta que pueda contener naturalmente el organismo, incluidas las malas hierbas solanáceas:
 - durante el año de cultivo siguiente al de declaración de contaminación:
 - o bien no se plantarán tubérculos, plantas ni semillas propiamente dichas de patata, ni cualquier otra planta que pueda contener naturalmente el organismo,
 - o
 - en el caso de los tubérculos de patata, se podrá plantar patata de siembra oficialmente certificada, pero solo para la producción de patata de consumo,
 - en el caso de las tomates, solamente se plantarán tomates obtenidas de semillas que cumplan los requisitos de la Directiva 2000/29/CE para la producción de fruto,
 - durante el segundo año de cultivo siguiente al de declaración de contaminación:
 - en el caso de las patatas, solamente se plantarán, para la producción de patatas de siembra o de consumo, patatas de siembra certificadas o patatas de siembra analizadas para determinar la inexistencia de podredumbre parda y cultivadas bajo control oficial en lugares de producción diferentes de los mencionados en el punto 4.1,
 - en el caso de los tomates, solamente se plantarán tomates obtenidas de semillas que cumplan los requisitos de la Directiva 2000/29/CE o, si se han propagado vegetativamente, de tomates producidas a partir de esas semillas y cultivadas bajo control oficial en lugares de producción diferentes de los mencionados en el punto 4.1, para la producción de plantas o de fruto,
 - durante al menos los tres años de cultivo siguientes a la declaración de la contaminación:
 - en el caso de las patatas, se plantarán para la producción de patatas de siembra o de consumo exclusivamente patatas de siembra certificadas o patatas de siembra que se hayan cultivado bajo control oficial a partir de patatas de siembra certificadas,
 - en el caso de los tomates, solamente se plantarán tomates obtenidas de semillas que cumplan los requisitos de la Directiva 2000/29/CE o tomates cultivadas bajo control oficial a partir de estas plantas, para la producción de plantas o de fruto,
 - en cada uno de los años de cultivo mencionados en los guiones anteriores, se tomarán medidas para eliminar las plantas de patata espontáneas y otras plantas que puedan contener naturalmente el organismo, si existen, y se efectuará una inspección oficial del cultivo en crecimiento en los momentos pertinentes y, en cada campo de patatas, se efectuarán pruebas oficiales de las patatas cosechadas con arreglo al procedimiento detallado en el anexo II;
- c) inmediatamente después de la declaración de contaminación prevista en el artículo 5, apartado 1, letra a), inciso ii), y tras el primer año de cultivo siguiente:
 - toda la maquinaria e instalaciones de almacenamiento del lugar de producción que se utilicen en la producción de patatas o tomates se limpiarán y, en su caso, desinfectarán utilizando métodos adecuados de la forma que se dispone en el punto 3,
 - con el fin de impedir la propagación del organismo, se efectuarán controles oficiales de los planes de riego y rociamiento y, en caso necesario, se prohibirán los mismos;

- d) en el caso de las unidades de producción de cultivos protegidos que hayan sido declaradas contaminadas en virtud del artículo 5, apartado 1, letra a), inciso ii), y en las que sea posible una sustitución total de los medios de cultivo:

- no se plantarán tubérculos, plantas ni semillas propiamente dichas de patata, ni otras plantas que puedan ser huésped del organismo, incluidas tomateras y semillas de tomateras, a menos que, por una parte, la unidad de producción se haya sometido a medidas oficialmente supervisadas que, teniendo por objeto la eliminación del organismo y la retirada de todo el material vegetal huésped, incluyan, como mínimo, un cambio completo de los medios de cultivo y una limpieza y, en su caso, una desinfección de tales unidades y de todo el equipo y que, por otra parte, los organismos oficiales responsables hayan dado subsiguientemente su autorización para la producción de patatas o tomates,

y

- además, la producción procederá, en el caso de la patata, de patatas de siembra certificadas o de minitubérculos o microplantas obtenidos de fuentes analizadas,
- en cuanto a la producción de tomates, la producción deberá proceder de semillas que cumplan los requisitos de la Directiva 2000/29/CE o, si se han propagado vegetativamente, de tomateras producidas a partir de estas semillas y cultivadas bajo control oficial,
- con el fin de impedir la propagación del organismo, se efectuarán controles oficiales de los planes de riego y rociamiento y, en caso necesario, se prohibirán los mismos.

4.2. Dentro de la zona delimitada, y sin perjuicio de las medidas dispuestas en el punto 4.1, los Estados miembros:

- a) inmediatamente después de la declaración de contaminación, garantizarán que se limpie y desinfecte toda la maquinaria e instalaciones de almacenamiento de la explotación que se hayan utilizado para la producción de patatas y tomates, como resulte adecuado y con los métodos apropiados, según lo dispuesto en el punto 3;
- b) inmediatamente y durante al menos tres años de cultivo después de la declaración de contaminación:
- ba) en los casos en que la delimitación de la zona se haya efectuado en virtud del artículo 5, apartado 1, letra a), inciso iv):
- garantizarán que sus organismos oficiales responsables supervisen las instalaciones que cultiven, almacenen o manipulen tubérculos de patata o tomates, así como aquellas otras instalaciones que utilicen en el marco de un contrato maquinaria para la producción de patatas o tomates,
 - requerirán que, para todos los cultivos de patata dentro de la zona delimitada, se planten exclusivamente semillas certificadas o semillas cultivadas bajo control oficial, y se efectúe un análisis después de cosechar los cultivos de patatas de siembra en lugares de producción determinados como probablemente contaminados según el artículo 5, apartado 1, letra a), inciso iii),
 - exigirán que se manipulen por separado las existencias de patatas de siembra y de patatas de consumo recolectadas en todas las explotaciones de la zona o, cuando sea adecuado, que se efectúe una desinfección entre la manipulación de las existencias de patatas de siembra y de patatas de consumo,
 - exigirán que, para todos los cultivos de tomate de la zona, solamente se planten tomateras obtenidas de semillas que cumplan los requisitos de la Directiva 2000/29/CE o, si se han propagado vegetativamente, de tomateras producidas a partir de estas semillas y cultivadas bajo control oficial,
 - efectuarán el examen oficial que dispone el artículo 2, apartado 1;
- bb) en los casos en que, en virtud del artículo 5, apartado 1, letra c), inciso ii), se hayan declarado contaminadas aguas de superficie o en que, de conformidad con el anexo V, punto 2, se hayan incluido dichas aguas entre los factores de la posible propagación del organismo:
- realizarán un examen anual, en los momentos oportunos, con una toma de muestras de las aguas de superficie y, cuando sea oportuno, de las plantas huésped solanáceas en las fuentes hídricas pertinentes, así como análisis con arreglo a los métodos pertinentes establecidos en el anexo II para el material vegetal indicado y para otros casos,

- con el fin de impedir la propagación del organismo, establecerán controles oficiales de los planes de riego y rociamiento, así como una prohibición del uso de las aguas declaradas contaminadas para el riego y rociamiento del material vegetal indicado y, en su caso, de otras plantas huésped. Esta prohibición podrá reexaminarse en función de los resultados obtenidos en el examen anual mencionado, y podrán revocarse las declaraciones cuando los organismos oficiales responsables tengan la certeza de que las aguas superficiales ya no están contaminadas. Podrá autorizarse el uso del agua sometida a prohibición, bajo control oficial, para el riego y el rociamiento de las plantas huésped, cuando se utilicen técnicas aprobadas oficialmente que eliminen el organismo y eviten su propagación,
 - en los casos en que se hayan contaminado vertidos de residuos líquidos, establecerán controles oficiales de la eliminación de los residuos sólidos o líquidos procedentes de las instalaciones industriales de transformación o envasado que manipulen el material vegetal indicado;
- c) establecerán, cuando sea pertinente, un programa para la sustitución en un plazo adecuado de todas las existencias de patatas de siembra.
-

ANEXO VII

Los métodos de eliminación de residuos autorizados oficialmente mencionados en el anexo VI, punto 1, deberán cumplir las disposiciones que se indican a continuación con el fin de evitar todo riesgo identificable de propagación del organismo:

- i) los residuos de patatas y tomates (incluidas las patatas, mondaduras y tomates descartados) y cualquier otro residuo sólido asociado con las patatas y los tomates (incluido el suelo, las piedras y otros restos) se eliminarán de una de las siguientes maneras:
 - en un vertedero de eliminación de residuos autorizado oficialmente en donde no exista ningún riesgo identificable de escape del organismo al medio ambiente, por ejemplo, a través de filtración a tierras agrícolas ni de contacto con fuentes de agua que puedan utilizarse para el riego de dichas tierras. Los residuos se conducirán directamente al vertedero en unas condiciones de confinamiento que impidan todo riesgo de pérdida de los mismos,
 - o
 - mediante incineración,
 - o
 - a través de otras medidas, siempre que se descarte el posible riesgo de propagación del organismo. Dichas medidas se notificarán inmediatamente a la Comisión y a los demás Estados miembros,
- ii) residuos líquidos: antes de la eliminación, los residuos líquidos que contengan sólidos en suspensión se someterán a procesos de filtración o sedimentación para eliminar dichos sólidos. Estos sólidos se eliminarán tal como se establece en el inciso i).

A continuación, los residuos líquidos:

- se calentarán a un mínimo de 60 °C en todo su volumen durante un mínimo de 30 minutos antes de la eliminación,
 - o
- se eliminarán, previa autorización oficial y bajo control oficial, de manera que no exista ningún riesgo identificable de que los residuos puedan entrar en contacto con tierras agrícolas ni fuentes de agua que pudieran utilizarse para la irrigación de tierras agrícolas. Los detalles de estas medidas se notificarán a los demás Estados miembros y a la Comisión.

Las opciones descritas en el presente anexo se aplican asimismo a los residuos asociados a la manipulación, la eliminación y el tratamiento de lotes contaminados.»

DIRECTIVA 2006/64/CE DE LA COMISIÓN**de 18 de julio de 2006****por la que se modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo a fin de incluir las sustancias activas clopiralida, ciprodinil, fosetil y trinexapac****(Texto pertinente a efectos del EEE)**

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Vista la Directiva 91/414/CEE del Consejo, de 15 de julio de 1991, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios ⁽¹⁾, y, en particular, su artículo 6, apartado 1,

Considerando lo siguiente:

- (1) Los Reglamentos de la Comisión (CE) n° 451/2000 ⁽²⁾ y (CE) n° 703/2001 ⁽³⁾ establecen las disposiciones de aplicación de la segunda fase del programa de trabajo contemplado en el artículo 8, apartado 2, de la Directiva 91/414/CEE, así como una lista de sustancias activas que deben evaluarse con vistas a su posible inclusión en el anexo I de la Directiva 91/414/CEE. Dicha lista incluye las sustancias clopiralida, ciprodinil, fosetil y trinexapac.
- (2) Los efectos de dichas sustancias activas sobre la salud humana y el medio ambiente se han evaluado de acuerdo con lo dispuesto en los Reglamentos (CE) n° 451/2000 y (CE) n° 703/2001 en lo relativo a una serie de usos propuestos por los notificantes. Dichos Reglamentos designan, además, los Estados miembros ponentes que han de presentar a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) los informes de evaluación y las recomendaciones pertinentes, de conformidad con el artículo 8, apartado 1, del Reglamento (CE) n° 451/2000. Respecto a la clopiralida, el Estado miembro ponente fue Finlandia y toda la información pertinente se presentó el 2 de diciembre de 2003. Por lo que respecta al ciprodinil y el fosetil, el Estado miembro ponente fue Francia y toda la información pertinente se presentó el 16 de enero de 2004 y el 20 de octubre de 2003, respectivamente. Por lo que respecta al trinexapac, se designó a los Países Bajos como Estado miembro ponente, y toda la información pertinente se presentó el 7 de noviembre de 2003.
- (3) Los informes de evaluación fueron sometidos a una revisión *inter pares* por parte de los Estados miembros y la EFSA, y se presentaron a la Comisión el 14 de diciembre de 2005 como informes científicos de la EFSA relativos a

la clopiralida, el ciprodinil, el fosetil y el trinexapac ⁽⁴⁾. Estos informes fueron revisados por los Estados miembros y la Comisión en el Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal y fueron adoptados el 4 de abril de 2006 como informes de revisión de la Comisión relativos a la clopiralida, ciprodinil, el fosetil y el trinexapac.

- (4) Según los diversos exámenes efectuados, cabe esperar que los productos fitosanitarios que contengan clopiralida, ciprodinil, fosetil y trinexapac satisfagan, en general, los requisitos establecidos en el artículo 5, apartado 1, letras a) y b), de la Directiva 91/414/CEE, sobre todo respecto a los usos examinados y detallados en los informes de revisión de la Comisión. Procede, pues, incluir estas sustancias activas en el anexo I para garantizar que los productos fitosanitarios que las contengan puedan autorizarse en todos los Estados miembros de conformidad con lo dispuesto en dicha Directiva.
- (5) Sin perjuicio de esta conclusión, conviene obtener información adicional sobre algunos puntos específicos en lo que se refiere a la clopiralida, el ciprodinil y el fosetil. El artículo 6, apartado 1, de la Directiva 91/414/CE establece que la inclusión de una sustancia en el anexo I podrá estar sujeta a condiciones. Por tanto, es conveniente exigir que la clopiralida, el ciprodinil y el fosetil sean sometidos a ensayos adicionales a fin de confirmar la evaluación del riesgo para algunas cuestiones, y que dichos estudios sean presentados por los notificantes.

⁽¹⁾ DO L 230 de 19.8.1991, p. 1. Directiva modificada en último lugar por la Directiva 2006/45/CE de la Comisión (DO L 130 de 18.5.2006, p. 27).

⁽²⁾ DO L 55 de 29.2.2000, p. 25. Reglamento modificado en último lugar por el Reglamento (CE) n° 1 044/2003 (DO L 151 de 19.6.2003, p. 32).

⁽³⁾ DO L 98 de 7.4.2001, p. 6.

⁽⁴⁾ EFSA Scientific Report (2005) 50, 1-65, Conclusion regarding the Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance clopyralid [Informe científico de la EFSA (2005) 50, 1-65, Conclusión relativa a la revisión inter pares de la evaluación del riesgo de plaguicidas de la sustancia activa clopiralida] (fecha de finalización: 14 de diciembre de 2005).

EFSA Scientific Report (2005) 51, 1-78, Conclusion regarding the Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance ciprodinil [Informe científico de la EFSA (2005) 51, 1-78, Conclusión relativa a la revisión inter pares de la evaluación del riesgo de plaguicidas de la sustancia activa ciprodinil] (fecha de finalización: 14 de diciembre de 2005).

EFSA Scientific Report (2005) 54, 1-79, Conclusion regarding the Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance foseethyl [Informe científico de la EFSA (2005) 54, 1-79, Conclusión relativa a la revisión inter pares de la evaluación del riesgo de plaguicidas de la sustancia activa fosetil] (fecha de finalización: 14 de diciembre de 2005).

EFSA Scientific Report (2005) 57, 1-70, Conclusion regarding the Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance trinexapac [Informe científico de la EFSA (2005) 57, 1-70, Conclusión relativa a la revisión inter pares de la evaluación del riesgo de plaguicidas de la sustancia activa trinexapac] (fecha de finalización: 14 de diciembre de 2005).

- (6) Debe permitirse que, antes de la inclusión de una sustancia activa en el anexo I, transcurra un plazo razonable a fin de que los Estados miembros y las partes interesadas puedan prepararse para cumplir los nuevos requisitos que se vayan a derivar de la inclusión.
- (7) Sin perjuicio de las obligaciones definidas en la Directiva 91/414/CEE derivadas de la inclusión de una sustancia activa en el anexo I, debe permitirse que, tras la inclusión, los Estados miembros dispongan de un plazo de seis meses para revisar las autorizaciones vigentes de productos fitosanitarios que contengan clopiralida, ciprodinil, fosetil y trinexapac, con el fin de garantizar que se cumplan los requisitos establecidos en la Directiva 91/414/CEE, en particular en su artículo 13, así como las condiciones pertinentes establecidas en su anexo I. Los Estados miembros deben modificar, sustituir o retirar, según proceda, las autorizaciones vigentes de conformidad con lo dispuesto en la Directiva 91/414/CEE. No obstante el plazo mencionado, procede conceder un plazo más largo para la presentación y evaluación de la documentación completa especificada en el anexo III de la Directiva 91/414/CEE, para cada producto fitosanitario y cada uso propuesto, de conformidad con los principios uniformes enunciados en dicha Directiva.
- (8) La experiencia adquirida en anteriores inclusiones en el anexo I de la Directiva 91/414/CEE de sustancias activas evaluadas en el marco del Reglamento (CEE) n° 3600/92 de la Comisión ⁽¹⁾ pone de manifiesto que pueden surgir dificultades a la hora de interpretar las obligaciones de los titulares de las autorizaciones vigentes en lo que se refiere al acceso a los datos. Por lo tanto, para no añadir nuevas dificultades, es necesario aclarar las obligaciones de los Estados miembros, en particular la de comprobar que el titular de una autorización demuestre tener acceso a una documentación que cumpla los requisitos del anexo II de la mencionada Directiva. Esta aclaración, no obstante, no impone nuevas obligaciones a los Estados miembros o los titulares de autorizaciones respecto a las de directivas ya adoptadas para modificar el anexo I.
- (9) Procede, por tanto, modificar la Directiva 91/414/CEE en consecuencia.
- (10) Las medidas previstas en la presente Directiva se ajustan al dictamen del Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal.

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Artículo 1

El anexo I de la Directiva 91/414/CEE queda modificado con arreglo a lo dispuesto en el anexo de la presente Directiva.

Artículo 2

Los Estados miembros adoptarán y publicarán, a más tardar el 31 de octubre de 2007, las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas necesarias para dar cumplimiento a lo establecido en la presente Directiva. Comunicarán inmediatamente a la Comisión el texto de dichas disposiciones, así como una tabla de correspondencias entre las mismas y la presente Directiva.

Aplicarán dichas disposiciones a partir del 1 de noviembre de 2007.

Cuando los Estados miembros adopten tales disposiciones, éstas harán referencia a la presente Directiva o irán acompañadas de dicha referencia en su publicación oficial. Los Estados miembros establecerán las modalidades de dicha referencia.

Artículo 3

1. De conformidad con la Directiva 91/414/CEE, los Estados miembros modificarán o retirarán, cuando sea necesario, las autorizaciones vigentes de productos fitosanitarios que contengan las sustancias activas clopiralida, ciprodinil, fosetil y trinexapac no más tarde del 31 de octubre de 2007.

Antes de dicha fecha comprobarán, en particular, que se cumplen las condiciones previstas en el anexo I de la Directiva por lo que se refiere a la clopiralida, el ciprodinil, el fosetil y el trinexapac, con excepción de los requisitos indicados en la parte B de la entrada relativa a dicha sustancia activa, y que el titular de la autorización posee o tiene acceso a una documentación que reúne los requisitos del anexo II de la mencionada Directiva de conformidad con las condiciones de su artículo 13.

2. No obstante lo dispuesto en el apartado 1, todo producto fitosanitario autorizado que contenga clopiralida, ciprodinil, fosetil y trinexapac como única sustancia activa, o junto con otras sustancias activas incluidas todas ellas en el anexo I de la Directiva 91/414/CEE no más tarde del 30 de abril de 2007, será objeto de una nueva evaluación por parte de los Estados miembros de acuerdo con los principios uniformes previstos en el anexo VI de la citada Directiva, sobre la base de una documentación que reúna los requisitos establecidos en su anexo III y que tenga en cuenta la parte B de las entradas de su anexo I relativas a la clopiralida, el ciprodinil, el fosetil y el trinexapac, respectivamente. En función del resultado de esta evaluación, determinarán si el producto cumple las condiciones establecidas en el artículo 4, apartado 1, letras b), c), d) y e), de la Directiva 91/414/CEE.

⁽¹⁾ DO L 366 de 15.12.1992, p. 10. Reglamento modificado en último lugar por el Reglamento (CE) n° 2266/2000 (DO L 259 de 13.10.2000, p. 27).

Tras determinar dicho cumplimiento, los Estados miembros deberán:

- a) en el caso de un producto que contenga clopiralida, ciprodi-nil, fosetil y trinexapac como única sustancia activa, modifi-car o retirar la autorización, según proceda, a más tardar el 30 de abril de 2011,
- o
- b) en el caso de un producto que contenga clopiralida, ciprodi-nil, fosetil y trinexapac entre otras sustancias activas, modi-ficar o retirar la autorización, según proceda, a más tardar el 30 de abril de 2011, o en el plazo que establezca toda directiva por la que se hayan incluido las sustancias en cues-tión en el anexo I de la Directiva 91/414/CEE, si este plazo concluye después de dicha fecha.

Artículo 4

La presente Directiva entrará en vigor el 1 de mayo de 2007.

Artículo 5

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 18 de julio de 2006.

Por la Comisión

Markos KYPRIANOU

Miembro de la Comisión

ANEXO

Al final del cuadro del anexo I de la Directiva 91/414/CEE se añade la entrada siguiente:

Nº	Denominación común y números de identificación	Denominación UIQPA	Pureza (1)	Entrada en vigor	Caducidad de la inclusión	Disposiciones específicas
«131	Clopiralida Nº CAS 1702-17-6 Nº CICAP 455	Ácido 3,6-dicloropiridina-2-carboxílico	≥ 950 g/kg	1 de mayo de 2007	30 de abril de 2017	PARTE A Solo se podrán autorizar los usos como herbicida. PARTE B En la evaluación de las solicitudes de autorización de productos fitosanitarios que contienen clopiralida para usos diferentes de los correspondientes a aplicaciones de primavera, los Estados miembros prestarán especial atención a los criterios mencionados en el artículo 4, apartado 1, letra b), y velarán por que se faciliten todos los datos y la información necesarios antes de conceder dicha autorización. Para la aplicación de los principios uniformes del anexo VI, se tendrán en cuenta las conclusiones del informe de revisión de la clopiralida, y, en particular, sus apéndices I y II, tal y como se ultimó en el Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal el 4 de abril de 2006. En esta evaluación general, los Estados miembros deberán prestar especial atención a: — la protección de las plantas no diana y las aguas subterráneas en situaciones vulnerables; en su caso, las condiciones de autorización deberán incluir medidas de reducción del riesgo, y deberán iniciarse programas de vigilancia en las zonas vulnerables para controlar la posibilidad de contaminación de las aguas subterráneas. Los Estados miembros interesados solicitarán que se presenten estudios adicionales a fin de confirmar los resultados en el metabolismo de los animales. Velarán por que los notificantes a instancia de los cuales se ha incluido la clopiralida en el presente anexo faciliten dichos estudios a la Comisión en el plazo de dos años a partir de la entrada en vigor de la presente Directiva.
132	Ciprodimil Nº CAS 121522-61-2 Nº CICAP 511	(4-ciclopropil-6-metil-pirimidina-2-il)-fenilamina	≥ 980 g/kg	1 de mayo de 2007	30 de abril de 2017	PARTE A Solo se podrán autorizar los usos como fungicida. PARTE B Para la aplicación de los principios uniformes del anexo VI, se tendrán en cuenta las conclusiones del informe de revisión del ciprodimil, y, en particular, sus apéndices I y II, tal y como se ultimó en el Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal el 4 de abril de 2006. En esta evaluación general, los Estados miembros: — deberán prestar especial atención a la seguridad de los operarios y velar por que en las condiciones de uso se exija la utilización de equipos de protección individual adecuados, — deberán atender especialmente a la protección de las aves, los mamíferos y los organismos acuáticos; las condiciones de autorización deberán incluir medidas de reducción del riesgo, como zonas tampón. Los Estados miembros interesados solicitarán que se presenten estudios adicionales a fin de confirmar la evaluación del riesgo para las aves y los mamíferos y la posible presencia de residuos del metabolito CGA 304075 en los alimentos de origen animal. Velarán por que los notificantes a instancia de los cuales se ha incluido el ciprodimil en el presente anexo faciliten dichos estudios a la Comisión en el plazo de dos años a partir de la entrada en vigor de la presente Directiva.

Nº	Denominación común y números de identificación	Denominación UIQPA	Pureza ⁽¹⁾	Entrada en vigor	Caducidad de la inclusión	Disposiciones específicas
133	Fosetil Nº CAS 15845-66-6 Nº CIPAC 384	Hidrogenofosfonato de etilo	≥ 960 g/kg (expresado como fosetil-Al)	1 de mayo de 2007	30 de abril de 2017	PARTE A Solo se podrán autorizar los usos como fungicida. PARTE B Para la aplicación de los principios uniformes del anexo VI, se tendrán en cuenta las conclusiones del informe de revisión del fosetil, y, en particular, sus apéndices I y II, tal y como se ultimó en el Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal el 4 de abril de 2006. En esta evaluación general, los Estados miembros: — deberán atender especialmente a la protección de las aves, los mamíferos, los organismos acuáticos y los artrópodos no diana. Cuando sea pertinente, las condiciones de autorización deberán incluir medidas de reducción del riesgo, como zonas tampón. Los Estados miembros interesados solicitarán que se presenten estudios adicionales a fin de confirmar la evaluación del riesgo para los artrópodos no diana, en particular por lo que se refiere a su recuperación en el terreno, y para los mamíferos herbívoros. Velarán por que el notificante a instancias del cual se ha incluido el fosetil en el presente anexo facilite dichos estudios a la Comisión en el plazo de dos años a partir de la entrada en vigor de la presente Directiva.
134	Trinexapac Nº CAS 104273-73-6 Nº CICAP 732	Acido 4-(ciclopropilhidroximetileno)-3,5-dioxo-ciclohexano carboxílico	≥ 940g/kg (expresado como trinexapac-etil)	1 de mayo de 2007	30 de abril de 2017	PARTE A Solo se podrán autorizar los usos como regulador del crecimiento vegetal. PARTE B Para la aplicación de los principios uniformes del anexo VI, se tendrán en cuenta las conclusiones del informe de revisión del trinexapac, y, en particular, sus apéndices I y II, tal y como se ultimó en el Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal el 4 de abril de 2006. En esta evaluación general, los Estados miembros: — deberán atender especialmente a la protección de las aves y los mamíferos. En su caso, las condiciones de autorización deberán incluir medidas de reducción del riesgo.

⁽¹⁾ En los informes de revisión se incluyen más datos sobre la identidad y las especificaciones de las sustancias activas correspondientes.»