

II

(Atti per i quali la pubblicazione non è una condizione di applicabilità)

CONSIGLIO

DIRETTIVA 93/85/CEE DEL CONSIGLIO

del 4 ottobre 1993

concernente la lotta contro il marciume anulare della patata

IL CONSIGLIO DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità economica europea, in particolare l'articolo 43,

vista la proposta della Commissione ⁽¹⁾,

visto il parere del Parlamento europeo ⁽²⁾,

visto il parere del Comitato economico e sociale ⁽³⁾,

considerando che la produzione di patate occupa un posto importante nell'agricoltura della Comunità; che la resa di tale produzione è costantemente minacciata da organismi nocivi;

considerando che la protezione della coltivazione della patata contro tali organismi nocivi è necessaria non solo per mantenere intatta la resa, ma anche per aumentare la produttività dell'agricoltura;

considerando che le misure protettive contro l'introduzione di organismi nocivi nel territorio di uno Stato membro avrebbero efficacia limitata se detti organismi non venissero combattuti simultaneamente e metodicamente in tutta la Comunità e se non se ne prevenisse la disseminazione;

considerando che uno degli organismi nocivi per la patata è il «*Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al.», agente causale della malattia batterica denominata «marciume anulare della patata»; che questa malattia si è manifestata in una parte della Comunità e che sussistono ancora alcuni focolai d'infezione di scarsa entità;

considerando che in tutto il territorio della Comunità la coltivazione della patata è esposta ad un serio pericolo, se non si effettuano interventi efficaci per localizzare questa malattia, determinarne lo stato di diffusione, prevenirne l'insorgenza e la disseminazione e, qualora fosse constatata, impedirne la disseminazione e combatterla ai fini della sua eradicazione;

considerando che, per conseguire tale scopo, occorre adottare determinati criteri di lotta per la Comunità; che gli Stati membri devono inoltre avere la possibilità di adottare misure supplementari o più rigorose, qualora risultino necessarie e purché non vengano creati ostacoli alla circolazione delle patate nella Comunità, fatte salve le disposizioni della direttiva 77/93/CEE del Consiglio, del 21 dicembre 1976, concernente le misure di protezione contro l'introduzione nella Comunità di organismi nocivi ai vegetali o ai prodotti vegetali e contro la loro diffusione nella Comunità ⁽⁴⁾; che tali criteri devono essere notificati agli altri Stati membri e alla Commissione;

considerando che la direttiva 80/665/CEE del Consiglio, del 24 giugno 1980, concernente la lotta contro il marciume anulare della patata ⁽⁵⁾ prescrive agli Stati membri di adottare criteri minimi di lotta contro tale malattia;

⁽¹⁾ GU n. C 93 del 2. 4. 1993, pag. 12.

⁽²⁾ GU n. C 176 del 28. 6. 1993, pag. 210.

⁽³⁾ GU n. C 161 del 14. 6. 1993, pag. 18.

⁽⁴⁾ GU n. L 26 del 31. 1. 1977, pag. 20. Direttiva modificata da ultimo dalla direttiva 92/103/CEE della Commissione (GU n. L 363 dell'11. 12. 1992, pag. 1).

⁽⁵⁾ GU n. L 180 del 14. 7. 1980, pag. 30.

considerando che, da allora, si sono acquisite importanti conoscenze sul marciume anulare della patata e sull'individuazione dell'infezione trasmessa da tale malattia;

considerando che l'applicazione del regime fitosanitario della Comunità in un'area senza frontiere interne comporta il riesame e la modifica di talune disposizioni della direttiva 80/665/CEE;

considerando che, in seguito a tali esami, alcune disposizioni della direttiva 80/665/CEE sono risultate inadeguate e che è necessario precisare i criteri in causa;

considerando che, per i motivi sopra esposti, è opportuno abrogare la direttiva 80/665/CEE e adottare le disposizioni del caso;

considerando che tali disposizioni devono innanzitutto tenere conto del fatto che la malattia può rimanere ad uno stato latente e non essere scoperta durante il periodo di crescita delle patate o di immagazzinaggio dei tuberi e che essa può quindi essere efficacemente combattuta soltanto mediante la produzione e l'impiego di tuberi-seme indenni da infezione; che, in secondo luogo, è necessario effettuare accertamenti sistematici ufficiali per localizzarla; che la diffusione dell'infezione da pianta a pianta durante la stagione vegetativa non è il fattore più importante, ma che l'infezione può esistere nel periodo invernale in tuberi-seme provenienti da patate dimenticate (tuberi-seme spontanei), che costituiscono il più grave rischio di infezione da una stagione all'altra; che l'infezione si trasmette soprattutto quando le patate sono in contatto tra loro o con attrezzi utilizzati per l'impianto, la raccolta e la manipolazione, ovvero con imballaggi utilizzati per il trasporto e il magazzino, contaminati in occasione di un precedente contatto con patate infette; che questi oggetti contaminati possono conservare il loro potere infettivo per un certo tempo dal momento della contaminazione; che la disseminazione della malattia può essere ridotta o evitata mediante disinfezione degli oggetti in causa; che la contaminazione dei tuberi-seme rappresenta un grave rischio di diffusione dell'infezione;

considerando che, per stabilire i criteri di lotta generali e quelli supplementari o più rigorosi adottati dagli Stati membri per prevenire l'introduzione dell'infezione nel loro territorio, è opportuno stabilire tra gli Stati membri e la Commissione una stretta collaborazione nell'ambito del comitato fitosanitario permanente (in prosieguo: «comitato»),

HA ADOTTATO LA PRESENTE DIRETTIVA:

Articolo 1

Oggetto della presente direttiva sono i provvedimenti da adottare negli Stati membri per combattere il marciume anulare della patata provocato dall'agente patogeno *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. subsp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., in appresso denominato «organismo nocivo», al fine di:

- a) localizzarlo e determinarne la distribuzione,
- b) prevenirne la comparsa e la disseminazione,
- c) qualora venga individuato, prevenirne la disseminazione e combatterlo ai fini della sua eradicazione.

Articolo 2

1. Gli Stati membri effettuano sistematicamente indagini ufficiali riguardo all'organismo nocivo su tuberi e, se del caso, su piante di patata (*Solanum tuberosum* L.) originari dei rispettivi territori nazionali, per confermare l'assenza di detto organismo.

Per queste indagini, nel caso dei tuberi vanno prelevati campioni di tuberi-seme e di altri tuberi di patata, preferibilmente da partite immagazzinate, sottoponendoli a prove di laboratorio ufficiali o condotte sotto controllo ufficiale, utilizzando il metodo di cui all'allegato I per l'individuazione e la diagnosi dell'organismo nocivo. Se del caso, si può inoltre effettuare su altri campioni un'ispezione visiva ufficiale o condotta sotto controllo ufficiale comprendente il taglio di tuberi.

Nel caso di piante, queste indagini sono effettuate con i metodi idonei e i campioni sono sottoposti alle opportune prove ufficiali o condotte sotto controllo ufficiale.

Il numero, l'origine, la stratificazione e il momento del prelievo dei campioni sono stabiliti dall'organismo ufficiale responsabile quale definito dalla direttiva 77/93/CEE, in base a fondati principi scientifici e statistici e ai dati biologici relativi all'organismo nocivo, tenendo altresì conto dei sistemi particolari di produzione della patata negli Stati membri interessati. Gli altri Stati membri e la Commissione vengono informati annualmente dei particolari relativi a queste operazioni, in modo da garantire tra gli Stati membri livelli comparabili di certezza diagnostica per la conferma dell'assenza dell'organismo nocivo.

2. L'esito delle indagini ufficiali di cui al paragrafo 1 va notificato agli altri Stati membri e alla Commissione almeno una volta all'anno. Gli specifici elementi notificati hanno carattere riservato. Essi possono essere sottoposti al comitato secondo la procedura prevista all'articolo 16 bis della direttiva 77/93/CEE.

3. Le seguenti disposizioni possono essere adottate secondo la procedura prevista all'articolo 16 bis della direttiva 77/93/CEE:

- le modalità delle indagini di cui al paragrafo 1, da effettuare in base a fondati principi statistici e scientifici;
- le modalità della notificazione di cui al paragrafo 2.

4. Le seguenti disposizioni sono adottate secondo la procedura prevista all'articolo 16 bis della direttiva 73/93/CEE:

- il metodo idoneo per le indagini e le prove di cui al paragrafo 1, terzo comma.

Articolo 3

Gli Stati membri provvedono affinché ogniquale volta si sospetti o venga confermata la presenza nel loro territorio dell'organismo nocivo nelle piante e nei tuberi-seme o nei tuberi raccolti, immagazzinati o commercializzati, ne venga data comunicazione ai rispettivi organismi ufficiali responsabili.

Articolo 4

1. Qualora vi sia una manifestazione sospetta, gli organismi ufficiali responsabili dello Stato membro ove è stato segnalato il caso provvedono ad effettuare prove di laboratorio ufficiali o condotte sotto controllo ufficiale, utilizzando il metodo di cui all'allegato I e secondo quanto disposto nell'allegato II, punto 1, al fine di confermare o smentire la manifestazione sospetta; nel primo caso si applicano le disposizioni dell'allegato II, punto 2.

2. In attesa della conferma o smentita della manifestazione sospetta di cui al paragrafo 1, nei casi di manifestazione sospetta in cui:

- i) siano stati individuati sintomi diagnostici visivi della malattia, oppure,
- ii) sia risultata positiva una prova di immunofluorescenza, quale specificata nell'allegato I, o un'altra prova idonea;

gli organismi ufficiali responsabili degli Stati membri:

- a) vietano il movimento di tutte le partite o spedizioni da cui sono stati prelevati i campioni, a meno che non avvenga sotto il controllo dei servizi stessi e purché sia stata accertata l'inesistenza di rischi effettivi di disseminazione dell'organismo nocivo;
- b) attuano interventi opportuni per risalire all'origine della manifestazione sospetta;
- c) introducono altri provvedimenti cautelativi commisurati al rischio stimato, onde scongiurare la disseminazione dell'organismo nocivo. Tali provvedimenti possono comprendere in particolare il controllo ufficiale del trasporto di tutti gli altri tuberi o piante entro o da qualsiasi impianto associato alla manifestazione sospetta.

3. Le seguenti disposizioni possono essere adottate secondo la procedura prevista dall'articolo 16 bis della direttiva 77/93/CEE:

- i provvedimenti menzionati al paragrafo 2, lettera c).

4. Le seguenti disposizioni sono adottate secondo la procedura prevista all'articolo 16 bis della direttiva 77/93/CEE:

- le altre opportune prove di cui al paragrafo 2, punto ii)

Articolo 5

1. Qualora le prove di laboratorio ufficiali o condotte sotto controllo ufficiale utilizzando il metodo di cui all'allegato I confermino la presenza dell'organismo nocivo in un campione di tuberi, piante o parti di piante, gli organismi ufficiali competenti di uno Stato membro, sulla base di fondati principi scientifici, dei dati biologici relativi all'organismo nocivo e dei sistemi particolari di produzione, lavorazione e commercializzazione di detto Stato membro;

- a) dichiarano contaminati i tuberi o le piante, una spedizione e/o una partita, i macchinari, i veicoli, i battelli, il magazzino, o relative parti, nonché qualsiasi altro oggetto, compresi i materiali di imballaggio, da cui è stato prelevato il campione e, se del caso, il luogo o i luoghi di produzione e l'assemblaggio o gli assemblaggi dove sono stati raccolti i tuberi o le piante;
- b) determinano, tenuto conto delle disposizioni dell'allegato III, punto 1, l'entità della contaminazione probabile avvenuta tramite contatto prima o dopo la raccolta o attraverso un nesso tra il ciclo produttivo e la contaminazione dichiarata;
- c) delimitano una zona in base alla dichiarazione di contaminazione di cui alla lettera a), alla determinazione dell'entità della contaminazione probabile di cui alla lettera b) e alla potenziale disseminazione dell'organismo nocivo, tenuto conto delle disposizioni dell'allegato III, punto 2.

2. Gli Stati membri notificano immediatamente agli altri Stati membri e alla Commissione conformemente alle disposizioni dell'allegato III, punto 3, qualsiasi caso di contaminazione dichiarato ai sensi del paragrafo 1, lettera a) e i particolari relativi alla delimitazione della zona ai sensi del paragrafo 1, lettera c).

Gli elementi specifici della notifica sono da considerarsi riservati. Essi possono essere sottoposti al comitato secondo la procedura prevista all'articolo 16 bis della direttiva 77/93/CEE.

3. In seguito alla notifica di cui al paragrafo 2 e in base agli elementi ivi menzionati, gli altri Stati membri specificati nella notifica dichiarano, se del caso, la contaminazione, determinano l'entità della contaminazione probabile e delimitano una zona in conformità al paragrafo 1, lettere a), b) e c), rispettivamente.

Articolo 6

Gli Stati membri prescrivono che, se dei tuberi o delle piante sono stati dichiarati contaminati ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), le prove di cui all'articolo 4, paragrafo 1 vanno fatte su scorte di patate che hanno una relazione clonale con quelle contaminate. Le prove sono eseguite sul numero di tuberi o piante necessario per stabilire l'origine probabile dell'infezione e l'entità della contaminazione probabile, preferibilmente secondo il grado di rischio.

Una volta effettuate le prove si procede, se del caso, a una nuova dichiarazione di contaminazione, alla determinazione dell'entità della contaminazione probabile e alla delimitazione di una zona, rispettivamente ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettere a), b) e c).

Articolo 7

1. Gli Stati membri vietano la messa a dimora di tuberi o piante dichiarati contaminati ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a) e dispongono che essi, sotto il controllo degli organismi ufficiali competenti:

- siano distrutti, o
- siano altrimenti eliminati, nel quadro di interventi sotto controllo ufficiale, secondo quanto disposto nell'allegato IV, punto 1, sempre che sia stata accertata l'inesistenza di rischi identificabili di disseminazione dell'organismo nocivo.

2. Gli Stati membri vietano la messa a dimora di tuberi o piante ritenuti probabilmente contaminati ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera b) e, salvi restando i risultati delle prove di cui all'articolo 6 per le scorte di piante in relazione clonale, provvedono affinché, sotto il controllo degli organismi ufficiali competenti, detti tuberi o piante siano destinati ad un'utilizzazione idonea o vengano eliminati secondo quanto disposto nell'allegato IV, punto 2, in condizioni tali da escludere qualsiasi rischio identificabile di disseminazione dell'organismo nocivo.

3. Gli Stati membri prescrivono che i macchinari, i veicoli, i battelli, il magazzino, o relative parti, nonché qualsiasi altro oggetto, compresi i materiali d'imballaggio, dichiarati contaminati ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), o ritenuti probabilmente contaminati ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera b), siano distrutti, ovvero puliti e disinfettati secondo metodi adeguati di cui all'allegato IV, punto 3. Dopo la disinfezione, gli oggetti descritti non sono più considerati contaminati.

4. Fatte salve le misure messe in atto a norma dei paragrafi 1, 2 e 3 del presente articolo, gli Stati membri prescrivono una serie di interventi, quali sono specificati nell'allegato IV, punto 4, da attuare nella zona delimitata ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera c).

Articolo 8

1. Gli Stati membri dispongono che i tuberi-seme di patata debbano essere conformi ai requisiti della direttiva 77/93/CEE e derivare direttamente da materiali ottenuti nell'ambito di un programma ufficialmente approvato che sono risultati esenti dall'organismo nocivo in prove ufficiali o eseguite sotto controllo ufficiale, utilizzando il metodo di cui all'allegato I.

Dette prove sono eseguite:

- sulle piante del materiale clonale di partenza, qualora la contaminazione colpisca una produzione di tuberi-seme di patata,
- sulle piante del materiale clonale di partenza o su campioni rappresentativi dei tuberi-seme di base o degli stadi anteriori, negli altri casi.

2. Le seguenti disposizioni possono essere adottate secondo la procedura prevista dall'articolo 16 bis della direttiva 77/93/CEE:

- le modalità di applicazione del paragrafo 1, secondo comma, primo trattino,
- le disposizioni sui campioni rappresentativi di cui al paragrafo 1, secondo comma, secondo trattino.

Articolo 9

Gli Stati membri vietano la detenzione e la manipolazione dell'organismo nocivo.

Articolo 10

Fatte salve le disposizioni della direttiva 77/93/CEE, gli Stati membri possono autorizzare deroghe alle disposizioni degli articoli 6, 7 e 9 della presente direttiva per prove o scopi scientifici, nonché per lavori di selezione varietale, purché tali deroghe non compromettano il controllo dell'organismo nocivo e non creino un rischio di disseminazione dello stesso.

Articolo 11

Gli Stati membri possono adottare, qualora risultino necessarie, disposizioni supplementari o più rigorose per combattere l'organismo nocivo o per prevenirne la disseminazione, sempreché siano conformi alle disposizioni della direttiva 77/93/CEE.

Le disposizioni addizionali previste al primo comma possono comprendere la prescrizione che siano messi a dimora solo tuberi-seme di patate ufficialmente certificati o ufficialmente controllati per l'osservanza delle pertinenti norme fitosanitarie. Ciò si applica in particolare qualora gli agricoltori siano autorizzati ad usare, nella loro azienda, tube-

ri-seme di patate ottenute dal loro proprio raccolto e quando sono messi a dimora tuber-seme di produzione propria.

I particolari relativi a tali disposizioni vengono notificati agli altri Stati membri e alla Commissione.

Articolo 12

Le eventuali modifiche degli allegati della presente direttiva, da apportare tenendo conto degli sviluppi tecnici e scientifici, sono adottate secondo la procedura prevista dall'articolo 16 bis della direttiva 77/93/CEE.

Articolo 13

1. Gli Stati membri adottano e pubblicano, entro il 15 novembre 1993, le disposizioni legislative, regolamentari o amministrative necessarie per conformarsi alla presente direttiva. Essi ne informano direttamente la Commissione.

Quando gli Stati membri adottano tali disposizioni, queste contengono un riferimento alla presente direttiva o sono corredate di un siffatto riferimento all'atto della pubblicazione ufficiale. Le modalità di tale riferimento sono decise dagli Stati membri.

Gli Stati membri applicano dette disposizioni a decorrere dal 16 novembre 1993.

2. Gli Stati membri comunicano senza indugio alla Commissione tutte le disposizioni del diritto nazionale emanate nella materia disciplinata dalla presente direttiva. La Commissione ne informa gli altri Stati membri.

Articolo 14

La direttiva 80/665/CEE è abrogata con effetto al 16 novembre 1993.

Articolo 15

Gli Stati membri sono destinatari della presente direttiva.

Fatto a Lussemburgo, addì 4 ottobre 1993.

Per il Consiglio

Il Presidente

W. CLAES

ALLEGATO I

METODO PER L'INDIVIDUAZIONE E LA DIAGNOSI DEL BATTERIO DEL MARCIUME ANULARE DELLA PATATA, CLAVIBACTER MICHIGANENSIS (SMITH) DAVIS ET AL. IN SERIE DI TUBERI DI PATATA

1. **Rimozione del cono ombelicale**
 - 1.1. Lavare 200 tuberi in acqua corrente e rimuovere l'epidermide dal cono ombelicale di ogni tubero usando un bisturi regolarmente disinfettato o un pelapatate; la disinfezione deve essere effettuata immergendo il pelapatate in una soluzione di etanolo al 70 % ed esponendolo alla fiamma.
 - 1.2. Rimuovere accuratamente nuclei di tessuto dal cono ombelicale con un bisturi o un pelapatate. Ridurre al minimo il tessuto non vascolare in eccedenza. Una volta rimossi, i coni ombelicali devono essere trattati entro 24 ore (paragrafo 3), ovvero conservati a -20 °C per non più di due settimane.
2. **Indagine visiva volta ad accertare sintomi di marciume anulare**

Dopo aver rimosso il cono ombelicale, tagliare trasversalmente ogni tubero e verificare la presenza di eventuali sintomi di marciume anulare.

Spremere i tuberi e osservare i tessuti macerati che fuoriescono dal tessuto vascolare.

I primi sintomi sono una leggera trasparenza o semitrasparenza del tessuto senza rammollimento attorno al sistema vascolare, soprattutto in prossimità del cono ombelicale. L'anello vascolare sul cono ombelicale può presentare un colore leggermente più scuro del normale. Il primo sintomo facilmente riscontrabile è rappresentato da una colorazione giallastra dell'anello vascolare e da masserelle di consistenza casciosa che fuoriescono da vasi del tubero se quest'ultimo è spremuto leggermente. Tale essudazione contiene milioni di batteri. In questa fase il tessuto vascolare può assumere un colore bruno. Inizialmente questi sintomi possono interessare solo una parte dell'anello, non necessariamente vicino alla parte apicale, ed in seguito estendersi gradualmente all'intero anello. Con il progredire dell'infezione si verifica la distruzione del tessuto vascolare; la corteccia esterna può separarsi da quella interna. In fase di contaminazione avanzata compaiono screpolature sulla superficie del tubero che, ai bordi, sono spesso bruno-rossicce. In seguito, un'invasione fungina o batterica può mascherare i sintomi rendendo difficile, se non impossibile, la distinzione tra i sintomi di uno stadio avanzato del marciume anulare e quelli di altre cancrene della patata.
3. **Preparazione di campioni per colorazione di Gram, colorazione di immunofluorescenza (IF) e prove su melanzane**
 - 3.1. Omogeneizzare il cono ombelicale fino a completa macerazione in un diluente di nota atossicità per il *Corynebacterium sepedonicum*, ad esempio tampone fosfato isotonic (PBS) 0,05 M a pH 7,0 ad una temperatura inferiore a 30 °C; si consiglia di aggiungere un deflocculante atossico e può essere altresì necessario un antischiumogeno atossico (appendici 1 e 2). È da evitare un'eccessiva macerazione.
 - 3.2. Estrarre i batteri dall'omogeneizzato con uno dei metodi seguenti ⁽¹⁾:
 - A. a) Centrifugare per 10 minuti senza superare i 180 g.
 - b) Centrifugare il sopranatante per 10 minuti a non meno di 4000 g. Lasciar decantare e scartare il sopranatante.
 - B. a) Lasciar riposare il macerato per 30 minuti affinché i frammenti di tessuto si depositino. Lasciar decantare il sopranatante senza disturbare il sedimento.
 - b) Filtrare il sopranatante mediante carta filtrante (Whatman n. 1) posta in un filtro di vetro sinterizzato (n. 2 = 40 - 100 µm) utilizzando una pompa a vuoto. Raccogliere il filtrato in un tubo da centrifuga. Lavare il filtro con un PBS sterile fino ad un volume massimo di filtrato pari a 35 ml.
 - c) Centrifugare il filtrato per 20 minuti a non meno di 4000 g.
 - 3.3. Sospendere il precipitato in un tampone fosfato sterile 0,01 M a pH 7,2 (appendice 2) per ottenere un volume totale pari a circa 1 ml. Dividere in due parti uguali e conservarne una di riferimento mediante congelamento a -20 °C ⁽²⁾ o liofilizzazione. Dividere a metà l'altra parte, utilizzando una parte per la prova di immunofluorescenza e di colorazione Gram e l'altra per le prove sulle melanzane.

⁽¹⁾ Un metodo alternativo di estrazione è fornito da Dinesen, 1984.

⁽²⁾ È provato (Janse e Van Vaeckenberg, 1987) che il congelamento può ridurre la vitalità del batterio *Corynebacterium sepedonicum*. Si può ovviare al problema sospendendo il precipitato in una soluzione di glicerolo al 10 %.

- 3.4. È necessario che i controlli di *C. sepedonicum* che hanno dato esito positivo e i campioni siano trattati separatamente per evitare la contaminazione. Ciò è valido per i vetrini di immunofluorescenza e per le prove sulle melanzane.
4. **Colorazione di Gram**
- 4.1. Preparare colorazioni di Gram per tutte le diluizioni di precipitato (5.2.1) e per ogni tubero tagliato (2) che presenti trasparenze, marciume o altri sintomi sospetti. I campioni devono essere prelevati dal bordo di tessuti infetti.
- 4.2. Preparare colorazioni di Gram per colture note di *C. sepedonicum* e, se possibile, per tessuti contaminati naturalmente (5.1).
- 4.3. Individuare i campioni che contengono cellule corineformi Gram positive tipiche. In genere le cellule di *C. sepedonicum* misurano 0,8-1,2 µm di lunghezza e 0,4-0,6 µm di larghezza.

Un procedimento di colorazione adeguato è descritto nell'appendice 3.

I preparati basati su contaminazioni naturali o su colture isolate recenti mostrano spesso una predominanza di bastoncelli coccoidi che di solito sono leggermente più piccoli delle cellule di coltura in agar più vecchie. Nella maggior parte dei terreni di coltura le cellule di *C. sepedonicum* sono bastoncelli pleomorfi corineformi e possono presentare reazioni Gram variabili. Le cellule sono singole e si presentano a coppie con caratteristici «gomiti» tipici di divisione angolata e, occasionalmente, in gruppi irregolari, spesso definiti «cellule a palizzata» o «lettere cinesi».

5. **Descrizione schematica delle prove IF**
- 5.1. Utilizzare un antisiero con un ceppo noto di *C. sepedonicum* ATCC 33113 (NCPB 2137), O NCPB 2140, la cui concentrazione IF dovrebbe essere superiore a 1:600. Includere un controllo PBS nel vetrino di prova al fine di verificare se il coniugato costituito da immunoglobulina anti-coniglio e isotiocianato di fluoresceina (FITC) si combini in modo non specifico con le cellule batteriche. Il *Corynebacterium sepedonicum* (ATCC 33113 (NCPB 2137), NCPB 2140) dovrebbe essere utilizzato come controllo con antigene omologo in un vetrino separato. Nei casi in cui sia possibile si dovrebbe utilizzare tessuto contaminato naturalmente (conservato mediante liofilizzazione o congelamento a -20°C) come controllo analogo nello stesso vetrino (figura 2).
- 5.2. **Procedimento**
- 5.2.1. Preparare tre diluizioni seriate 1:10 (10^1 , 10^2 , 10^3) del precipitato finale in acqua distillata (figura 1).
- 5.2.2. Trasferire con una pipetta un volume standard di ogni diluizione di precipitato sufficiente a coprire il pozzetto del vetrino (circa 25 µl), o un volume di sospensione di *C. sepedonicum* (circa 10^6 cellule/ml) sufficiente per i pozzetti di un vetrino multiplo, come illustrato nella figura 1.

Figura 1

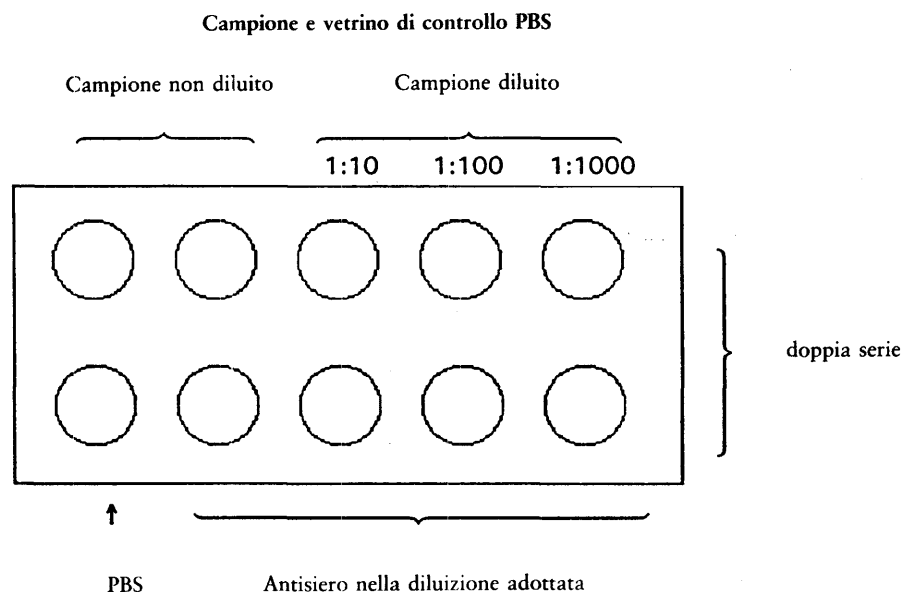
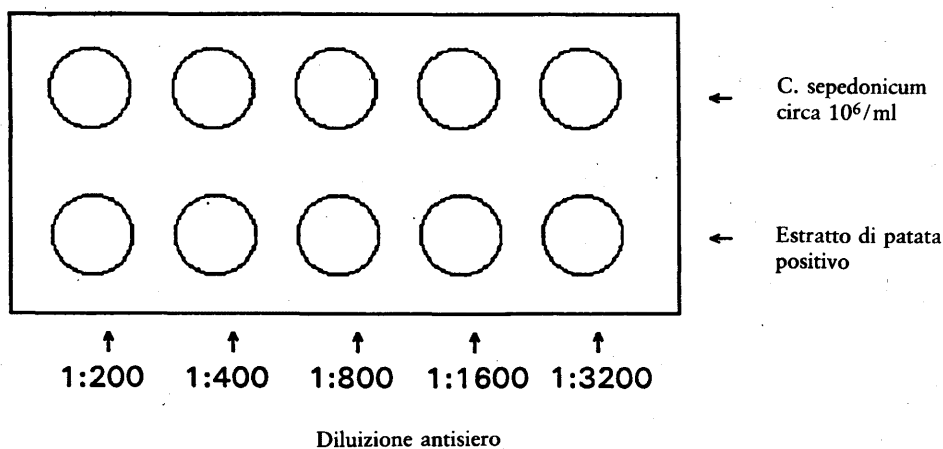


Figura 2

Vetrino di controllo positivo



- 5.2.3. Far seccare ad aria a 37 °C circa e procedere al fissaggi con una soluzione di etanolo al 95 % o mediante esposizione alla fiamma.
- 5.2.4. Coprire i vetrini con l'antisiero di *C. sepedonicum* alle diluizioni raccomandate, ossia PBS 0,01 M a pH 7,2 (appendice 2), come illustrato in figura 1. (Utilizzare il PBS per il controllo FITC.) La diluizione di lavoro dell'antisiero dovrebbe essere circa la metà della concentrazione IF. Qualora si debbano prevedere altre diluizioni di antisiero, è necessario approntare un vetrino separato per ogni diluizione.
- 5.2.5. Procedere all'incubazione in una camera umida a temperatura ambiente per 30 minuti.
- 5.2.6. Sciacquare accuratamente con un PBS 0,01 M, a pH 7,2. Lavare per 5 minuti con tre cambi di PBS 0,01 M, a pH 7,2.
- 5.2.7. Eliminare accuratamente l'umidità in eccesso.
- 5.2.8. Coprire ogni vetrino con un coniugato di FITC alla stessa diluizione utilizzato per determinare la concentrazione e procedere all'incubazione in una camera umida mantenuta al buio a temperatura ambiente per 30 minuti.
- 5.2.9. Sciacquare e lavare come sopra indicato.
- 5.2.10. Applicare 5-10 µl circa di tampone fosfato glicerico 0,1 M a pH 7,6 (o con un mezzo di contrasto analogo che abbia un pH non inferiore a 7,6) su ogni vetrino e chiudere con il coprioggetti (appendice 2).
- 5.2.11. Esaminare con un microscopio predisposto per la luce epifluorescente e dotato di filtri idonei per il coniugato FITC. L'ingrandimento richiesto è dell'ordine di 400-1 000. Esaminare il controllo ripetuto per i vetrini su 2 diametri ad angolo retto e attorno al perimetro dei vetrini.

Individuare le cellule fluorescenti nei controlli positivi e determinarne la concentrazione. Verificare la presenza di cellule fluorescenti nel vetrino del controllo FITC/PBS e, qualora non ve ne siano, passare al vetrino di prova. Determinare almeno in 10 campi di microscopio il numero medio di cellule fluorescenti a morfologia tipica esistenti in ogni campo e calcolare il numero di cellule per ml di precipitato non diluito (appendice 4).

La prova di immunofluorescenza presenta alcuni inconvenienti.

- Nei precipitati di patata è possibile che si manifesti la presenza di una popolazione di fondo di cellule fluorescenti con morfologia atipica e di batteri saprofiti a reazione incrociata simili per dimensioni e morfologia al *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Considerare soltanto le cellule fluorescenti aventi dimensioni e morfologia tipiche.

Vista la possibilità di reazioni incrociate, i campioni che hanno dato un esito positivo alla prova di immunofluorescenza dovrebbero essere sottoposti ad un'ulteriore prova utilizzando un altro antisiero.

- Il limite tecnico di rivelazione di questo metodo si attesta tra 10^3 e 10^4 , cellule per ml di precipitato non diluito, I campioni con conteggi di cellule IF tipiche al limite di rivelazione risultano in genere negativi per il *C. m. ssp. sepedonicus*, ma possono essere utilizzati per le prove sulle melanzane.

Ogni campione che non presenta cellule fluorescenti morfologicamente tipiche costituisce una prova di immunofluorescenza negativa. I campioni si considerano non contaminati da *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

La prova sulle melanzane non è richiesta.

Ogni campione che presenta cellule fluorescenti morfologicamente tipiche costituisce una prova di immunofluorescenza positiva.

I campioni che hanno dato esito positivo alla prova di immunofluorescenza effettuata con entrambi gli antisieri sono considerati *potenzialmente contaminati* dai *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

La prova sulle melanzane è richiesta per tutti i campioni potenzialmente contaminati.

6. **Prova sulle melanzane**

Per i dettagli relativi alla coltura si veda l'appendice 5.

6.1. Distribuire il precipitato di cui al precedente paragrafo 3.3 tra almeno 25 melanzane allo stadio fogliare (appendice 5), utilizzando uno dei metodi seguenti (6.2, 6.3 o 6.4).

6.2. *Inoculazione per incisione I*

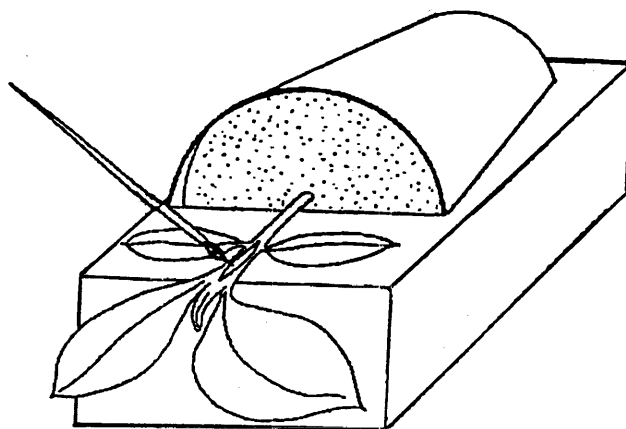
6.2.1. Mantenere ogni vaso in posizione orizzontale mediante un supporto (per un vaso di 10 cm si può utilizzare un blocchetto di polistirolo espanso con un incavo avente le seguenti dimensioni: 5 cm di profondità, 10 cm di larghezza e 15 cm di lunghezza [figura 3]). Fissare una striscia di lamina di alluminio sterile tra lo stelo e il blocchetto in ogni campione da esaminare. La pianta può essere tenuta ferma mediante un nastro di gomma attorno al blocchetto.

6.2.2. Usando un bisturi praticare tra i cotiledoni e la prima foglia un taglio longitudinale o leggermente diagonale della lunghezza di 0,5-1,0 cm e di profondità pari a circa tre quarti del diametro dello stelo.

6.2.3. Tenere l'incisione aperta con la punta del bisturi e spennellare l'interno con l'inoculo mediante un idoneo pennellino impregnato di precipitato. Distribuire il precipitato rimanente tra le melanzane.

6.2.4. Sigillare il taglio con vaselina sterile utilizzando una siringa da 2 ml.

Figura 3



6.3. *Inoculazione per incisione II*

6.3.1. Tenendo la pianta con due dita, versare mediante una pipetta una goccia (5-10 µl circa) del precipitato sospeso sullo stelo tra cotiledoni e la prima foglia.

6.3.2. Usando un bisturi sterile, praticare un'incisione diagonale (con un angolo di 5° circa) lunga 1,0 cm e di profondità pari a circa $\frac{2}{3}$ dello spessore dello stelo. Il taglio deve iniziare al disotto della goccia di precipitato.

6.3.3. Sigillare il taglio con vaselina sterile mediante siringa.

6.4. *Inoculazione mediante siringa*

6.4.1. Al fine di ridurre il turgore, le melanzane non devono essere lavate il giorno precedente all'inoculazione.

- 6.4.2. Inoculare gli steli di melanzana immediatamente sopra i cotiledoni usando una siringa con ago ipodermico (non inferiore a 23G). Distribuire il precipitato tra le melanzane.
- 6.5. Inoculare in 25 piante una coltura nota di *C. sepedonicum* e, se possibile, tessuto di tuberi naturalmente contaminati (5.1) con lo stesso metodo di inoculazione (6.2, 6.3 o 6.4).
- 6.6. Inoculare un PBS sterile 0,05 M in 25 piante con lo stesso metodo di inoculazione (6.2, 6.3 o 6.4).
- 6.7. Mantenere le piante in incubazione in condizioni adeguate (appendice 5) per 40 giorni. Esaminarle periodicamente per vedere se appaiono sintomi ogni otto giorni. Contare il numero di piante che manifestano sintomi di contaminazione. Nelle melanzane il *C. sepedonicum* provoca avvizzimento delle foglie, che può iniziare sotto forma di flaccidità lungo il bordo o fra le nervature. Il tessuto avvizzito può apparire inizialmente verde scuro o chiazzato, ma si schiarisce prima di divenire necrotico. La zona avvizzita fra le nervature ha spesso un aspetto viscido e impregnato d'acqua. Il tessuto necrotico ha sovente un bordo giallo vivo. Le piante non sono necessariamente morte; quanto più lungo è il periodo che precede la manifestazione dei sintomi, tanto maggiore è la possibilità di sopravvivenza. Le piante possono superare l'infezione. Le piante di melanzane giovani predisposte sono molto più sensibili alle basse popolazioni di *C. sepedonicum* rispetto alle piante più vecchie; è pertanto necessario utilizzare piante che abbiano raggiunto o stiano per raggiungere lo stadio fogliare 3.

L'avvizzimento può anche essere provocato da popolazioni di altri batteri o funghi presenti nel precipitato di tessuto di tubero, fra i quali si annoverano *l'Erwinia carotovora*, sottospecie *carotovora* e *l'E. carotovora*, sottospecie *atroseptica*, la *Phoma exigua*, varietà *foveata*, nonché ampie popolazioni di batteri saprofiti. Tale avvizzimento può essere distinto da quello provocato dal *C. sepedonicum* in quanto intere foglie o intere piante avvizziscono rapidamente.

- 6.8. Preparare una colorazione di Gram (4) per tutte le serie di melanzane che manifestano sintomi di contaminazione, utilizzando sezioni di tessuto di foglie avvizzite e di tessuto dello stelo delle piante e isolarle su un adeguato terreno nutritivo (7). Disinfettare la superficie delle foglie e degli steli di melanzana strofinandole con etanolo al 70 %.
- 6.9. In talune circostanze, in particolare quando le condizioni di crescita non sono ottimali, è possibile che la contaminazione da *C. sepedonicum* rimanga latente fra le melanzane anche dopo il periodo d'incubazione di 40 giorni. Tali contaminazioni possono provocare un arresto della crescita e mancanza di vigore nelle piante assoggettate all'inoculazione. Se la prova di IF è considerata positiva, può essere ritenuto necessario eseguire altre prove. A tal fine è essenziale confrontare i tassi di crescita di tutte le piante di melanzane sottoposte alla prova con i PBS sterili 0,05 M come controllo negativo e sorvegliare le condizioni ambientali della serra.

Per le ulteriori prove si raccomanda di:

- 6.9.1. Recidere lo stelo sopra al punto in cui è stata effettuata l'inoculazione e asportare le foglie.
- 6.9.2. Macerare gli steli in un PBS 0,05 M a pH 7,0, come indicato ai punti 3.1 e 3.2.
- 6.9.3. Usare metà del precipitato per effettuare una colorazione di Gram (4) e una prova di immunofluorescenza.
- 6.9.4. Usare l'altra metà del precipitato per effettuare un'ulteriore prova sulle melanzane se la colorazione di Gram e/o la prova di immunofluorescenza sono positive. Usare una coltura di *C. sepedonicum* nota e PBS sterili 0,05 M come controllo negativo. Se nella prova successiva non si osservano sintomi, il campione deve essere considerato negativo.

7. Isolamento del *C. sepedonicum*

La diagnosi può essere confermata solo se il *C. sepedonicum* è isolato e individuato come tale (8). Benché il *C. sepedonicum* sia un organismo esigente, esso può essere isolato dal tessuto sintomatico. Tale contaminazione può tuttavia essere superata in presenza di batteri saprofiti a crescita rapida e pertanto non è raccomandato l'isolamento direttamente dal precipitato di tessuto di tubero (3.3). Le melanzane costituiscono un ottimo terreno di arricchimento selettivo per la crescita del *C. sepedonicum* e rappresentano inoltre un eccellente ospite per una prova di conferma.

L'isolamento deve essere effettuato su tutti i tuberi e le melanzane sintomatici (4, 6). La macerazione degli steli delle melanzane deve essere effettuata, se del caso, come indicato ai punti 3 e 6.9.

- 7.1. Applicare la sospensione su uno dei seguenti terreni di coltura (le formule figurano nell'appendice 6):

agar nutritivo con destrosio (solo per subcolture);
agar con lievito peptone glucosio;
agar nutritivo con lievito destrosio;
yeast extract mineral salts agar.

Mantenere in incubazione a 21 °C per un massimo di 20 giorni.

Il *C. sepedonicum* cresce lentamente, producendo di solito colonie puntiformi a cupola, di color bianco panna entro 10 giorni.

Riapplicare per ottenere la purezza.

I tassi di crescita sono migliori con le subcolture. Le colonie tipiche sono di color bianco panna o avorio, di forma arrotondata a cupola convessa, liscia, in rilievo, di consistenza viscoso-fluida con bordi continui e un diametro di 1-3 mm.

Individuazione

Molti batteri corineiformi Gram-positivi, le cui colonie presentano caratteristiche analoghe a quelle del *C. sepedonicum* possono essere isolati su patate e melanzane sane o infette. In questo contesto il *C. sepedonicum* deve essere individuato con le seguenti prove:

prova di immunofluorescenza (5.1);

prova sulle melanzane;

prove nutrizionali e fisiologiche (appendice 7):

- prova di ossidazione/fermentazione (O/F),
- prova dell'ossidasi,
- crescita a 37 °C,
- produzione di ureasi,
- idrolisi dell'esculina,
- idrolisi dell'amido,
- tolleranza ad una soluzione di cloruro di sodio al 7 %;
- prova dell'indolo,
- prova della catalasi,
- produzione di H₂S,
- utilizzazione del citrato,
- idrolisi della gelatina,
- acidi derivati dal glicerolo, dal lattosio, dal ramnosio e dalla salicina,
- colorazione di Gram.

Tutte le prove devono comprendere un campione di controllo noto di *C. sepedonicum*. Le prove nutrizionali e fisiologiche dovrebbero essere effettuate inoculando sostanze ricavate dalle subcolture su agar nutritivo con destrosio.

Per la prova di immunofluorescenza le popolazioni di cellule dovrebbero essere utilizzate con una densità di 10⁶ cellule/ml. Il titolo di immunofluorescenza dovrebbe essere analogo a quello della coltura nota di *C. sepedonicum*.

Per la prova sulle melanzane le popolazioni di cellule dovrebbero avere una densità di circa 10⁷ cellule/ml. Le prove sulle melanzane dovrebbero essere effettuate utilizzando dieci piante per ciascuno degli organismi della prova, usando nuovamente controlli di coltura di *C. sepedonicum* e di acqua sterile; nel caso di colture pure il tipico avvizzimento dovrebbe manifestarsi entro venti giorni, ma le piante che non mostrano sintomi dopo questo periodo dovrebbero essere mantenute in incubazione per un totale di trenta giorni a temperature che permettano la crescita delle melanzane, ma che non siano superiori a 30 °C (appendice 5). Se, trascorsi trenta giorni, non si manifestano sintomi di infezione, non è possibile confermare che la coltura sia una forma patogena di *Corynebacterium sepedonicum*.

<i>Prova</i>	<i>C. sepedonicum</i>
O/F	Inerte o debolmente ossidativo
Ossidasi	—
Catalasi	+
Riduzione del nitrato	—
Attività dell'ureasi	—
Produzione di H ₂ S	—
Produzione di indolo	—
Utilizzazione del citrato	—
Idrolisi dell'amido	— o debole
Crescita a 37 °C	—
Crescita in una soluzione di NaCl al 7 %	—
Idrolisi della gelatina	—
Idrolisi dell'esculina	+
Acidi derivati da:	
— glicerolo	—
— lattosio	— o debole
ramnosio	—
salicina	—

*Appendice 1***FORMULA DEL FLUIDO DI MACERAZIONE RACCOMANDATO DA LELLIOTT E SELLAR, 1976**

Antischiuma al silicone (Hopkins & Williams Ltd, Cat No 9964 – 25, Chadwell Heath, Essex, Inghilterra)	10 ml
Scaglie antiemulsionanti (ICI Ltd)	0,5 g
Pirofosfato tetrasodico	1 g
Tampone fosfato isototonico 0,05 M a pH 7,0 (appendice 2)	1 litro

*Appendice 2***TAMPONI****Tampone fosfato isototonico 0,05 M a pH 7,0**

Questo tampone può essere usato per la macerazione del tessuto dei tuberi (2.1)

Na_2HPO_4	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
NaCl	8,0 g
Acqua distillata	1 litro

Tampone fosfato isototonico 0,01 M a pH 7,2

Questo tampone è utilizzato per diluire antisieri e per lavare i vetrini utilizzati per l'IF

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 : 12\text{H}_2\text{O}$	2,7 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 : 2\text{H}_2\text{O}$	0,4 g
NaCl	8,0 g
Acqua distillata	1 litro

Tampone fosfato aggiunto di glicerina 0,1 M a pH 7,6

Questo tampone è utilizzato come mezzo di contrasto per aumentare la fluorescenza delle prova di IF

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 : 12\text{H}_2\text{O}$	3,2 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 : 2\text{H}_2\text{O}$	0,15 g
Glicerina	50 ml
Acqua distillata	100 ml

Appendice 3

PROCEDURA PER LA COLORAZIONE DI GRAM (MODIFICA DI HUCKER) (DOETSCH, 1981)**Soluzione di cristavioletto**

Sciogliere 2 g di cristavioletto in 20 ml di etanolo al 95 %.

Sciogliere 0,8 g di ossalato di ammonio in 80 ml di acqua distillata.

Mescolare le due soluzioni.

Soluzioni di Lugol

Iodio	1 g
-------	-----

Ioduro di potassio	2 g
--------------------	-----

Acqua distillata	300 ml
------------------	--------

Polverizzare insieme gli elementi solidi in un mortaio con il pestello. Aggiungere all'acqua e mescolare per disciogliere in un recipiente chiuso.

Soluzione per colorazione alla safranina

Soluzione di riserva:

Safranina O	2,5 mg
-------------	--------

Etanolo al 95 %	100 ml
-----------------	--------

Mescolare e mettere da parte.

Diluire in una proporzione 1:10 per ottenere una soluzione adeguata.

Procedimento di colorazione

1. Preparare gli strisci, seccare ad aria e fissare mediante calore.
2. Bagnare il vetrino con la soluzione al cristavioletto per un minuto.
3. Lavare rapidamente con acqua corrente.
4. Bagnare con soluzione di Lugol per un minuto.
5. Lavare con acqua corrente e asciugare tamponando.
6. Decolorare con etanolo al 95 %, aggiungendolo goccia a goccia finché non si verifica più alcuna decolorazione, oppure immergendovi lo striscio e scuotendo con cautela per 30 secondi.
7. Lavare in acqua corrente e asciugare tamponando.
8. Bagnare con la soluzione di safranina per 10 secondi.
9. Lavare con acqua corrente e asciugare tamponando.

I batteri Gram-positivi si colorano di blu-violetto, i batteri Gram-negativi di rosa-rosso.

Appendice 4

DETERMINAZIONE DELLA POPOLAZIONE DI CELLULE POSITIVE
ALL'IMMUNOFLUORESCENZA

Superficie del pozzetto del vetrino per immunofluorescenza

$$= \frac{\pi D^2}{4} \quad (1)$$

in cui D = diametro del pozzetto.

Superficie del campo dell'obiettivo

$$= \frac{\pi d^2}{4} \quad (2)$$

in cui d = diametro dell'obiettivo.

Calcolare d misurando direttamente o mediante le seguenti formule:

$$s = \frac{\pi i^2}{G^2 K^2 \times 4} \quad (3)$$

dove i = coefficiente di campo (dipende dal tipo di oculare e varia da 8 a 24),
K = coefficiente del microscopio (1 o 1,25),
G = ingrandimento dell'obiettivo (100 volte, 40 volte, ecc.).

$$\text{Da (2) } d = \sqrt{\frac{4s}{\pi}}$$

$$\text{Da (3) } d = \sqrt{\frac{4 \times \frac{\pi i^2}{G^2 K^2 \times 4}}{\pi}} = \frac{i}{GK} \quad (4)$$

Conteggiare il numero di cellule IF tipiche per campo (c).

Calcolare il numero di cellule IF tipiche per pozzetto (C).

$$C = c \frac{S}{s}$$

Calcolare il numero di cellule IF tipiche per ml di precipitato (N)

$$N = C \times \frac{1\,000}{y} \times F$$

in cui y = volume del precipitato sul pozzetto

in cui F = fattore di diluizione del precipitato.

Appendice 5

COLTURA SU MELANZANE

Seminare i semi di melanzana (*Solanum melongena*, varietà Black Beauty) in terra da semina pastorizzata. Trapiantare le piantine con cotiledoni completamente sviluppati (10-14 giorni) in terra da piantare in vaso pastorizzata.

Usare le melanzane ad uno stadio fogliare 3, quando due e non più di tre foglie si sono completamente aperte.

Le melanzane dovrebbero essere coltivate in una serra nelle seguenti condizioni ambientali:

luce: 14 ore o lunghezza naturale del giorno se maggiore;

temperatura: diurna: 21-24 °C;

notturna: 15 °C.

NB: Il *C. sepedonicum* non si svilupperà a temperature > 30 °C. Se le temperature notturne non scendono a 15 °C, può verificarsi una degradazione del marcatore fluorescente.

Danni alle radici causati da larve di sciaride possono essere evitati applicando un insetticida appropriato.

Le melanzane Black Beauty possono essere ottenute presso:

1. AB Hammenhögs Frö
270 50 Hammenhög
Svezia
2. HURST Seeds Ltd
Avenue Road
Witham
Essex CM8 2DX
Inghilterra
3. ASGRO Italia S.p.A
Corso Lodi, 23
Milano
4. KÜPPER
Mitteldeutsche Samen GmbH
Hessenring 22
D-37269 Esdchwege

Appendice 6

TERRENI DI COLTURA PER LA CRESCITA E L'ISOLAMENTO DEL C. SEPEDONICUM

Agar nutriente (NA)

Agar nutriente difco bacto in acqua distillata nella concentrazione fornita dal produttore. Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Agar nutriente al destrosio (NDA)

Agar nutriente difco bacto contenente l'1 % di D(+)glucosio (monoidrato). Sterilizzare in autoclave a 115 °C per 20 minuti.

Agar lievito peptone glucosio (YPGA)

Estratto di lievito difco bacto (n. 0127)	5 g
Peptone difco bacto (n. 0118)	5 g
D(+)glucosio (monoidrato)	10 g
Agar purificato difco bacto (n. 0560)	15 g
Acqua distillata	1 litro

Sterilizzare volumi di mezzo litro di terreno di coltura in autoclave a 115 °C per 20 minuti.

Terreno di coltura all'estratto di lievito e ai sali minerali (YGM)

Difco bacto estratto di lievito	2,0 g
D(+)glucosio (monoidrato)	2,5 g
K ₂ HPO ₄	0,25 g
KH ₂ PO ₄	0,25 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1 g
MnSO ₄ · H ₂ O	0,015 g
NaCl	0,05 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,005 g
Agar purificato difco bacto	18 g
Acqua distillata	1 litro

Sterilizzare volumi di mezzo litro di terreno di coltura in autoclave a 115 °C per 20 minuti.

Appendice 7

PROVE NUTRITIVE E FISIOLOGICHE PER L'INDIVIDUAZIONE DEL C. SEPEDONICUM

Tutti i terreni di coltura dovrebbero essere messi in incubazione a 21°C e esaminati dopo 6 giorni. Se non si è verificata alcuna crescita, incubare fino a 20 giorni.

— Prova di ossidazione e fermentazione (Hugh & Leifson, 1953) — prova O/F

Terreno di coltura basale:

KCl	0,2 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	1,0 g
Peptone difco bacto	1,0 g
Agar purificato difco bacto	3,0 g
D(+) -Glucosio (monoidrato)	10,0 g
Azzurro di bromotimolo	0,03 g
Acqua distillata	1 litro

Miscelare e dosare fino a raggiungere pH 7,0–7,2 con 1N KOH.

Preparare in provette di coltura pirex di 16 mm × 100 mm (capacità 12 ml) in volumi di 5 ml e 10 ml.

Sterilizzare in autoclave a 115 °C per 10 minuti.

Inoculare per infissione provette di 5 ml e di 10 ml per ciascuna coltura. Aggiungere asetticamente 1-2 ml di paraffina liquida sterile nella provetta da 10 ml. Mettere in incubazione.

Reazione positiva:

Provetta	Colore	Interpretazione
aperta chiusa	giallo } giallo }	fermentazione
aperta chiusa	giallo } verde-azzurro }	ossidazione
aperta chiusa	verdastrò } verde-azzurro }	ossidazione o inerte

— Prova di ossidasi (Kovacs, 1956)

Reagente ossidasico di Kovacs:

L'1 % di soluzione acquosa di tetrametil parafenilnediammina di idrocloruro (BDH n. 30386) in acqua distillata.

Questo reagente dovrebbe essere preparato all'istante in volumi di 1 ml ma può essere conservato in una bottiglia di vetro marrone a 5 °C per 1-4 settimane.

Mettere una goccia di reagente su carta da filtro in una scatola di Petri pulita. Raschiare una parte della coltura di prova utilizzando un'ansa di platino.

Reazione positiva: sviluppo di una colorazione purpurea entro 10 secondi. Le colture con tempi di colorazione di 10-30 secondi sono moderatamente positive.

NB: È essenziale utilizzare un'ansa di platino e colture di NA in quanto tracce di ferro o un elevato tenore di zucchero nel terreno di coltura impiegato per la crescita possono fornire falsi risultati positivi.

— Produzione di acido in base a lattosio, ramnosio, salicina, glicerina

Preparare il terreno di coltura O/F Hugh & Leifson senza il glucosio. Distribuire in volumi di 5 ml in provette. Sterilizzare in autoclave a 115 °C per 10 minuti. Aggiungere asetticamente alla base sciolta, a 45 °C, 0,5 ml di soluzione acquose al 10 %, sterilizzate a filtro, di glicerina o lattosio o ramnosio o salicina. Miscelare accuratamente.

Reazione positiva: se il colore passa dal verde-azzurro al giallo ciò significa che vi è produzione di acido.

— Test della catalasi

Mettere una goccia di acqua ossigenata (volume 30) su un vetrino pulito ed emulsionare con un'ansa piena di terreno di coltura utilizzando un'ansa di platino.

Reazione positiva: la produzione di bollicine di ossigeno nella goccia indica la presenza di catalasi.

— Attività nitrato riduttasi e denitrificazione (Bradbury, 1970)

Terreno di coltura:

KNO ₃ (libero da nitrato)	1 g
Estratto di lievito difco bacto	1 g
K ₂ HPO ₄	5 g
Acqua distillata	1 litro

Preparare in volumi di 10 ml e versare in bottiglie da 20 ml. Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Reagente A:

H ₂ SO ₄	8 g
5N acido acetico	1 litro

Reagente B:

Naftilammina	5 g
5N acido acetico	1 litro

Inoculare un duplice terreno di coltura al nitrato. Effettuare una prova dopo 10 e 20 giorni aggiungendo una goccia di soluzione di Lugol, 0,5 ml di reagente A e 0,5 ml di reagente B. Se il terreno di coltura non diventa rossastro, aggiungere circa 50 mg di polvere di zinco. Osservare la reazione cromatica.

Reazione positiva:

Reazione cromatica

	Fase 1	Fase 2
Nessuna riduzione del nitrato	incolore	rosso
Riduzione del nitrato fino al nitrito (solo nitrito riduttasi)	rosso	—
Riduzione del nitrato oltre il nitrito (denitrificazione — nitrato e nitrito riduttasi)	incolore	incolore

— Produzione di ureasi (Lelliott, 1966)

Terreno di coltura basale:

Oxoid urea agar base (CM53)	2,4 g
Acqua distillata	95 ml

Sterilizzare in autoclave a 115 °C per 20 minuti. Raffreddare la base sciolta fino a raggiungere la temperatura di 50 °C e aggiungere asetticamente 5 ml di soluzione acquosa di urea al 40 % sterilizzata a filtro (Ossoide SR20). Miscelare bene.

Distribuire in volumi di 6 ml in provette sterili (16 × 100 ml) e lasciare solidificare in posizione inclinata con un buon supporto.

Reazione positiva: il terreno di coltura-giallo. arancione assume un colore rosso ciliegia o magenta se l'attività di ureasi ha avuto luogo.

Utilizzazione di citrato (Christensen) (Skerman, 1967)

Base agar al citrato (Merck 2503)	23 g
Acqua distillata	1 litro

Miscelare e dissolvere con calore. Preparare in volumi di 6 ml come per il terreno di coltura per l'urea. Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti e lasciare solidificare in posizione inclinata.

Reazione positiva: l'utilizzazione del citrato è indicata da un cambiamento del colore del terreno di coltura dall'arancione al rosso.

— Produzione di acido solfidrico (Ramamurthi, 1959)

Terreno di coltura:

Triptone difco bacto (n. 0123)	10 g
K ₂ HPO ₄	1 g
NaCl	5 g
Acqua distillata	1 litro

Dissolvere e preparare in volumi di 6 ml che vanno collocati in provette da 16 × 100 mm. Sterilizzare in autoclave a 115 °C per 10 minuti.

Inoculare e sospendere asetticamente una carta all'acetato di piombo (Merck 9511) dall'orlo della provetta. Tenere fermo con il coperchio. Incubare fino a 20 giorni.

Reazione positiva: La produzione di H₂S dal triptone è indicata dal fatto che la carta reattiva assume un colore nero-marrone.

— Produzione di indolo (Ramamurthi, 1959)

Terreno di coltura:

come per la prova H₂S.

Togliere la carta all'acetato di piombo e aggiungere 1–2 ml di etere di dietile e scuotere lievemente. Aspettare che gli strati si separino (5 minuti). Aggiungere prudentemente 0,5 ml di reagente di Kovacs (Merck 9293), all'interno della provetta inclinata.

Reazione positiva: la presenza di indolo è indicata dall'apparizione di colore rosso all'interno dello strato giallo tra l'etere e le frazioni acquose.

— Crescita a 37 °C (Ramamurthi, 1959)

Terreno di coltura:

Brodo nutritivo difco bacto (n. 0003)	8 g
Acqua distillata	1 l

Mescolare, sciogliere e distribuire in provette di 6 ml di volume.

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Inoculare e procedere all'incubazione a 37 °C.

Reazione positiva: controllo della crescita.

— Crescita in cloruro di sodio al 7 % (Ramamurthi, 1959)

Terreno di coltura:

Brodo nutritivo difco bacto	8g
NaCl	70 g
Acqua distillata	1 litro

Mescolare, sciogliere e distribuire in provette di 6 ml di volume.

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Reazione positiva: controllo della crescita.

— Idrolisi della gelatina (Lelliott, Billing & Hayward, 1966)

Terreno di coltura:

Gelatina difco bacto (n. 0143)	120 g
Acqua distillata	1 litro

Mescolare, sciogliere col calore e distribuire in provette di 6 ml di volume.

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Reazione positiva: liquefazione della gelatina anche se mantenuta a 5 °C per 30 minuti.

— Idrolisi dell'amido

Terreno di coltura:

Agar nutriente difco bacto (fuso)	1 litro
Amido solubile difco bacto (n. 0178)	2 g

Miscelare e sterilizzare in autoclave a 115 °C per 10 minuti.

Applicare sulle piastre. Inoculare la reazione delle piastre.

Una volta verificatasi una buona crescita (10–20 giorni), rimuovere parte di essa e irrigare con iodio Lugol.

Reazione positiva: l'idrolisi dell'amido è caratterizzata da zone chiare al disotto o attorno alla crescita batterica; il resto del terreno mostra una colorazione porpora.

— Idrolasi dell'esculina (Sneath & Collins, 1974)

Terreno di coltura:

Peptone difco bacto	10 g
Esculina	1 g
Citrato ferrico (Merck 3862)	0,05 g
Citrato di sodio	1 g
Acqua distillata	1 l

Miscelare e far sciogliere e dividere in volumi da 6 ml versando la soluzione nei tubi. Sterilizzare in autoclave a 115 °C per 10 minuti.

Il terreno è chiaro ma ha una fluorescenza bluastra.

Reazione positiva: l'idrolasi dell'esculina è indicata da un colore bruno e dalla scomparsa della fluorescenza. Ciò può essere verificato usando una lampada a radiazione ultravioletta.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Bradbury, J. F., 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. *Rev. Pl. Path.*, 49, 213-218.
- Dinesen, I. G., 1984. The extraction and diagnosis of *Corynebacterium sepedonicum* from diseased potato tubers. *EPPO Bull.* 14 (2), 147-152.
- Doetsch, R. N., 1981. Determinative methods of light microscopy. In: *Manual of methods for general bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington, 21-23.
- Hugh, R. and Leifson, F., 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. *J. Bact.*, 66, 24-26.
- Janse, J. D. and Van Vaerenbergh, J. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (*Corynebacterium sepedonicum*) in potato. *EPPO Bull.*, n° 17, 1987, p. 1-10.
- Kovacs, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature, Lond.*, 178, 703.
- Lelliott, R. A., 1966. The plant pathogenic coryneform bacteria. *J. appl. Bact.*, 29, 114-118.
- Lelliott, R. A., Billing, E. and Hayward, A. C., 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *J. appl. Bact.*, 29, 470-489.
- Lelliott, R. A., and Sellar, P. W., 1976. The detection of latent ring rot (*Corynebacterium sepedonicum* (Spiek. et Kotth.) Skapt. et Burkh.) in potato stocks. *EPPO Bull.*, 6 (2), 101-106.
- Ramamurthi, C. S., 1959. Comparative studies on some Gram-positive phytopathogenic bacteria and their relationship to the Corynebacteria. *Mem. Cornell agric. Exp. Sta.*, 366, 52 p.
- Skerman, V. B. D., 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria. 2nd ed., William and Wilkins Company, Baltimore.
- Sneath, P. H. A. and Collins, V. G., 1974. A study in test reproductibility between laboratories: report of *Pseudomonas* working party. *Antonie van Leeuwenhoek*, 40, 481-527.

ALLEGATO II

1. Per ogni manifestazione sospetta per la quale sia stata praticata una prova di immunofluorescenza positiva secondo il metodo di cui all'allegato I, e per la quale si attenda la conferma o la smentita attraverso il suddetto metodo, è necessario mantenere e conservare in condizioni adeguate:
 - tutti i campioni di tuberî o piante, ove possibile, e
 - ogni estratto residuo e i vetrini di immunofluorescenza supplementari preparati,fino al termine delle prove condotte secondo il suddetto metodo,
2. Qualora venga confermata la presenza dell'organismo nocivo, è necessario mantenere e conservare in condizioni adeguate:
 - il materiale di cui al paragrafo 1,
 - un campione conservato del materiale di melanzana infetto inoculato con il tubero o con l'estratto e
 - la coltura isolata dell'organismo,per almeno un mese dalla notifica di cui all'articolo 5, paragrafo 2 della direttiva.

ALLEGATO III

1. Per determinare l'entità della contaminazione probabile, di cui all'articolo 5, paragrafo 1, lettera b) della direttiva, è necessario tenere conto dei seguenti elementi:
 - tuberi o piante coltivati in un luogo di produzione dichiarato contaminato ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a);
 - luogo o luoghi di produzione o imprese che abbiano qualche collegamento nel ciclo produttivo con i tuberi o le piante vegetali dichiarati contaminati ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a) compresi quelli dove vengono condivisi macchinari e dispositivi di produzione indirettamente o attraverso un imprenditore comune;
 - tuberi o piante prodotti nel luogo o nei luoghi di produzione di cui al precedente trattino, o presenti in tali luoghi di produzione nel periodo in cui i tuberi o le piante dichiarati contaminati ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a) erano presenti nelle imprese o nei luoghi di produzione di cui al primo trattino;
 - magazzini centrali adibiti alla manipolazione di patate provenienti dai luoghi di produzione di cui sopra;
 - macchinari, veicoli, contenitori, magazzini, o relative parti, e qualsiasi altro oggetto, compresi i materiali d'imballaggio, che possano essere stati in contatto con i tuberi o le piante dichiarati contaminati ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), durante i dodici mesi precedenti, oppure laddove se ne ravvisi la necessità;
 - tuberi o piante immagazzinati o entrati in contatto con una qualsiasi delle strutture o degli oggetti elencati nel precedente trattino prima della pulizia o della disinfezione di tali strutture o oggetti;
 - dopo le prove di cui all'articolo 6, tuberi o piante che abbiano la stessa origine clonale dei tuberi o delle piante dichiarati contaminati ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a) e per i quali le indagini facciano ritenere probabile la contaminazione.
2. Per determinare la potenziale disseminazione di cui all'articolo 5, paragrafo 1, lettera c) della presente direttiva, è necessario tenere conto dei seguenti elementi:
 - la vicinanza di altri luoghi di produzione della patata o di altre piante ospiti dell'organismo nocivo;
 - l'esistenza di scorte comuni di tuberi-seme di patata.
3. I particolari della notifica di cui all'articolo 5, paragrafo 2, primo comma della presente direttiva comprendono:
 - per ogni spedizione o partita di patate dichiarate contaminate, i certificati prescritti dagli articoli 7 o 8 della direttiva 77/93/CEE, il numero di passaporto o di registrazione, a seconda dei casi;
 - il nome della varietà delle scorte di tuberi-seme e per tutti gli altri casi, ove possibile;
 - una descrizione degli elementi relativi alla dichiarazione di contaminazione e alla delimitazione della zona;
 - la disponibilità di un estratto, dei vetrini di immunofluorescenza preparati, del materiale di melanzana infetto e di una coltura isolata dell'organismo nocivo provenienti dalle prove in cui è stata confermata la presenza di detto organismo.

ALLEGATO IV

1. Gli interventi sotto controllo ufficiale previsti dall'articolo 7, paragrafo 1 della direttiva per l'eliminazione di tuberi o piante dichiarati contaminati ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a) della stessa direttiva sono:
 - la destinazione alla trasformazione industriale, attraverso la consegna diretta e immediata a uno stabilimento dotato di apposite strutture per l'eliminazione dei rifiuti che escludano qualsiasi rischio identificabile di disseminazione dell'organismo nocivo e provvisto di dispositivi per la disinfezione delle aree di magazzinaggio e dei veicoli in uscita; o
 - altri interventi, sempreché sia stato accertato che non esiste alcun rischio effettivo di disseminazione dell'organismo nocivo; tali interventi vengono notificati alla Commissione e agli altri Stati membri.
2. L'utilizzazione o l'eliminazione idonee di tuberi o piante probabilmente contaminati ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera b), di cui all'articolo 7, paragrafo 2, da effettuarsi sotto il controllo degli organismi ufficiali responsabili dello Stato membro, comprendono:
 - il loro impiego quali patate da consumo, in imballaggi pronti per la consegna diretta e l'utilizzazione senza necessità di reimballaggio, e destinate a tale consegna diretta e utilizzazione;
 - il loro impiego quali patate da consumo destinate alla trasformazione industriale e consegnate direttamente e immediatamente ad uno stabilimento dotato di strutture apposite per l'eliminazione dei rifiuti e la disinfezione;
 - altri impieghi o forme di eliminazione, sempre che sia accertato che non esiste alcun rischio identificabile di disseminazione dell'organismo nocivo.
3. I metodi adeguati di pulizia e disinfezione di tutti gli oggetti di cui all'articolo 7, paragrafo 3 sono quelli che escludono qualsiasi rischio identificabile di disseminazione dell'organismo nocivo e che vengono applicati sotto il controllo degli organismi ufficiali responsabili degli Stati membri.
4. La serie di interventi che gli Stati membri attuano nella zona delimitata ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera c) e di cui all'articolo 7, paragrafo 4 della presente direttiva, comprende quanto segue:
 - 4.1. nei luoghi di produzione dichiarati contaminati ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a):
 - a) in un appezzamento dichiarato contaminato ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a):
 - i) — per almeno i tre anni vegetativi successivi a quello in cui la contaminazione è stata dichiarata:
 - si attuano interventi intesi ad eliminare le piante di patate spontanee e altre piante ospiti naturali dell'organismo nocivo;
 - è vietato mettere a dimora tuberi, piante o semi di patate propriamente detti, o altre piante ospiti naturali dell'organismo nocivo, o colture per le quali sussiste un rischio effettivo di sopravvivenza o di disseminazione di detto organismo, fino a quando l'appezzamento non risulta privo di piante di patate spontanee per almeno due anni vegetativi consecutivi;
 - nel primo periodo di raccolta delle patate che segue il periodo indicato al trattino precedente, tuberi-seme ufficialmente certificati sono messi a dimora unicamente per la produzione di patate da consumo e viene effettuato un accertamento ufficiale come precisato all'articolo 2, paragrafo 1;
 - nel periodo di raccolta delle patate successivo a quello indicato al trattino precedente, e in seguito a un appropriato ciclo di rotazione, tuberi-seme ufficialmente certificati sono messi a dimora per la produzione sia a scopo di consumo che di semina e viene effettuato un accertamento ufficiale come precisato all'articolo 2, paragrafo 1; oppure
 - ii) — nei quattro anni vegetativi successivi a quello in cui la contaminazione è stata dichiarata:
 - si attuano interventi intesi ad eliminare le piante di patate spontanee e altre piante ospiti naturali dell'organismo nocivo; e
 - l'appezzamento viene messo e tenuto o a maggese completo oppure a pascolo permanente e si effettuano frequenti falciature a raso oppure l'appezzamento viene adibito a pascolo intensivo;
 - nel primo periodo di raccolta delle patate che segue il periodo indicato al trattino precedente, tuberi-seme ufficialmente certificati sono messi a dimora per la produzione sia di piante che di patate da consumo e viene effettuato un accertamento ufficiale come precisato all'articolo 2, paragrafo 1;

- b) negli altri appezzamenti:
- nell'anno vegetativo successivo a quello della contaminazione dichiarata:
 - è vietato mettere a dimora tuberi, piante o semi di patata propriamente detti o altre piante ospiti naturali dell'organismo nocivo, e vengono attuati interventi per eliminare eventualmente le piante di patate spontanee; oppure
 - tuberi-seme di patate ufficialmente certificati possono essere messi a dimora soltanto per la produzione di patate da consumo, a condizione che gli organismi ufficiali competenti abbiano la certezza che il rischio di piante di patate spontanee e altre piante ospiti naturali dell'organismo nocivo sia stato eliminato;
 - almeno nei primi due anni vegetativi successivi a quello precisato al trattino precedente, sono messi a dimora soltanto tuberi-seme ufficialmente certificati, sia a scopo di consumo che di semina;
 - in ciascuno degli anni vegetativi precisati nei trattini precedenti, si attuano gli interventi diretti ad eliminare piante di patate spontanee e altre piante ospiti naturali dell'organismo nocivo e si effettuano gli accertamenti ufficiali di cui all'articolo 2, paragrafo 1;
 - ove tuberi-seme di patata ufficialmente certificati siano messi a dimora per la produzione di patate nell'anno vegetativo successivo a quello in cui la contaminazione è stata dichiarata la crescita delle patate è sottoposta a controlli nei momenti opportuni e si effettuano prove sulle piante di patata spontanee per individuare la presenza dell'organismo nocivo;
- c) non appena è avvenuta la dichiarazione di contaminazione ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a) e in ciascuno degli anni vegetativi successivi fino al primo periodo di raccolta possibile delle patate nell'appezzamento o negli appezzamenti dichiarati contaminati, come specificato alla lettera a), tutti i macchinari e le strutture di immagazzinamento presenti sul luogo di produzione e associati al ciclo produttivo delle patate sono opportunamente puliti e disinfettati con i metodi adeguati, conformemente al punto 3;
- d) nei sistemi di produzione che rendono possibile la sostituzione completa del substrato colturale:
- è vietato mettere a dimora tuberi, piante o semi propriamente detti a meno che l'unità di produzione sia stata sottoposta a interventi sotto controllo ufficiali intesi ad eliminare l'organismo nocivo e a rimuovere qualsiasi patata o altro materiale di Solanacee, compresi almeno il cambiamento completo del substrato colturale e la pulizia e la disinfezione dell'unità di produzione e di tutte le attrezzature, e purché gli organismi ufficiali responsabili abbiano successivamente autorizzato la produzione di patate;
 - la produzione di patate si effettua a partire da tuberi-seme di patate ufficialmente certificati, o da microtuberi o piantine ottenuti da fonti controllate;

4.2. all'interno della zona delimitata, fatti salvi gli interventi previsti al punto 4.1, gli Stati membri:

- a) immediatamente dopo la contaminazione dichiarata e per almeno tre periodi vegetativi:
- garantiscono il controllo, attraverso i propri organismi ufficiali responsabili, delle imprese dove viene effettuata la coltivazione, il magazzinaggio o la manipolazione dei tuberi di patata, nonché delle imprese che gestiscono, su base contrattuale, i macchinari occorrenti;
 - esigono la pulizia e la disinfezione dei macchinari e dei magazzini presenti in tali imprese, se del caso, utilizzando i metodi adeguati precisati al punto 3,
 - esigono l'impiego esclusivo di semi certificati per tutte le colture di patata comprese in tale zona;
 - prescrivono che la manipolazione delle patate da semina raccolte sia separata da quella delle patate da consumo, in tutte le imprese della zona;
 - effettuano gli accertamenti ufficiali di cui all'articolo 2, paragrafo 1;
- b) stabiliscono se del caso un programma volto a sostituire tutte le scorte di tuberi-seme in un lasso di tempo adeguato.

Gli interventi attuati ai sensi del punto 4.2, unitamente ai numeri di registrazione dei produttori, dei magazzini collettivi e dei centri di spedizione situati nella zona delimitata, vengono notificati ogni anno agli altri Stati membri e alla Commissione.