

32006L0056

4.7.2006

JURNALUL OFICIAL AL UNIUNII EUROPENE

L 182/1

**DIRECTIVA 2006/56/CE A COMISIEI
din 12 iunie 2006**

de modificare a anexelor la Directiva 93/85/CEE a Consiliului privind combaterea veștejirii bacteriene a cartofului

COMISIA COMUNITĂȚILOR EUROPENE,

având în vedere Tratatul de instituire a Comunității Europene,

având în vedere Directiva 93/85/CEE a Consiliului din 4 octombrie 1993 privind combaterea veștejirii bacteriene a cartofului ⁽¹⁾, în special articolul 12,

întrucât:

- (1) Unul dintre organismele dăunătoare pe care le găsim pe cartof este *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis *et al.* ssp. *sepedonicus* (Spieckermann și Kotthoff) Davis *et al.*, agent patogen al bolii numite „veștejirea bacteriană a cartofului” (denumit în continuare „agent patogen”).
- (2) Organismul menționat este încă prezent în anumite părți ale Comunității.
- (3) Directiva 93/85/CEE a Consiliului a definit măsurile detaliate pe care statele membre trebuie să le adopte împotriva organismului respectiv, pentru a-l localiza și a-i stabili distribuția, pentru a-i preveni apariția și răspândirea și, în cazul în care este detectat, pentru a-i preveni răspândirea și pentru a-l controla în vederea eradicării.
- (4) De atunci s-au realizat progrese importante în înțelegerea biologiei, precum și în procedurile de detectare și de identificare a organismului respectiv. De asemenea, experiențele practice dobândite în lupta împotriva acestui organism necesită o reexaminare a mai multor dispoziții tehnice privind măsurile de combatere.
- (5) Ținând seama de noile elemente, se dovedește necesară revizuirea și actualizarea măsurilor prevăzute de anexele la Directiva 93/85/CEE.

(6) În ceea ce privește procedurile de detectare și de identificare, sunt incluse metode descoperite recent, respectiv hibridizarea fluorescentă *in situ* (FISH) și reacția în lanț prin polimerază (PCR), precum și îmbunătățiri ale diverselor elemente tehnice ale procedurii actuale de detectare și de identificare.

(7) În ceea ce privește elementele tehnice ale măsurilor de combatere, au fost prevăzute dispoziții îmbunătățite pentru modul de conservare a eșantioanelor testate pentru a garanta trasabilitatea organismului, elementele necesare pentru determinarea extinderii contaminării probabile, modalitățile de notificare a unei prezențe confirmate a organismului și zona contaminată examinată, precum și măsurile de punere în aplicare în locurile de producție declarate contaminate și în zonele delimitate.

(8) Măsurile prevăzute de prezenta directivă sunt conforme cu avizul Comitetului permanent fitosanitar,

ADOPTĂ PREZENTA DIRECTIVĂ:

Articolul 1

Anexele la Directiva 93/85/CEE se înlocuiesc cu textele corespunzătoare care figurează în anexa la prezenta directivă.

Articolul 2

(1) Statele membre adoptă și publică, până la 31 martie 2007, actele cu putere de lege și actele administrative necesare pentru a se conforma prezentei directive. Statele membre comunică de îndată Comisiei textul acestor acte, precum și un tabel de corespondență între actele în cauză și directivă.

Statele membre aplică aceste acte de la 1 aprilie 2007.

Atunci când statele membre adoptă aceste acte, ele cuprind o trimitere la prezenta directivă sau sunt însoțite de o asemenea trimitere la data publicării lor oficiale. Statele membre stabilesc modalitatea de efectuare a acestei trimiteri.

⁽¹⁾ JO L 259, 18.10.1993, p. 2.

(2) Comisiei îi sunt comunicate de îndată de statele membre textele principalelor dispoziții de drept intern pe care le adoptă în domeniul reglementat de prezenta directivă.

Articolul 3

Prezenta directivă intră în vigoare în a treia zi de la data publicării în *Jurnalul Oficial al Uniunii Europene*.

Articolul 4

Prezenta directivă se adresează statelor membre.

Adoptată la Bruxelles, 12 iunie 2006.

Pentru Comisie

Markos KYPRIANOU

Membru al Comisiei

ANEXA I

**PROTOCOLUL DE TESTARE ÎN VEDEREA DIAGNOSTICĂRII, DETECTĂRII ȘI IDENTIFICĂRII
AGENTULUI RESPONSABIL DE VEȘTEJIREA BACTERIANĂ A CARTOFULUI, *CLAVIBACTER
MICHIGANENSIS* (Smith) Davis *et al.* ssp. *SEPEDONICUS* (Spieckermann și Kotthoff) Davis *et al.*****DOMENIU DE APLICARE AL PROTOCOLULUI DE TESTARE**

Protocolul prezentat în continuare descrie diferitele etape ce trebuie urmate pentru:

- (i) diagnosticarea veștejirii bacteriene pe tuberculii și pe plantele de cartof;
- (ii) detectarea *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* pe eșantioane de tuberculi și de plante de cartof;
- (iii) identificarea *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*C. m.* ssp. *sepedonicus*).

PRINCIPII GENERALE

Protocoloalele optimizate pentru diversele metode, reactivii validați și modalitățile de preparare a materialului necesar pentru teste și pentru controale figurează în apendice. În apendicele 1 se furnizează o listă a laboratoarelor incluse pentru optimizarea și validarea protocoalelor.

Deoarece protocoalele implică detectarea unui organism dăunător care trebuie pus în carantină și includ utilizarea culturilor viabile de *C. m.* ssp. *sepedonicus* ca materiale de control, este necesar ca procedurile să se desfășoare în condiții adecvate de carantină, cu instalații corespunzătoare de eliminare a deșeurilor și cu respectarea cerințelor referitoare la licențele corespunzătoare emise de autoritățile oficiale responsabile pentru carantină.

Parametrii testelor trebuie să garanteze o detectare coerentă și reproductibilă a nivelurilor de *C. m.* ssp. *sepedonicus* la pragurile stabilite pentru metodele selecționate.

Este necesară pregătirea exactă a marilor pozitivi.

Realizarea testelor în funcție de pragurile cerute implică, de asemenea, stabilirea parametrilor corecți, întreținerea și calibrarea echipamentelor, manevrarea și conservarea atentă a reactivilor și toate măsurile care vizează să împiedice contaminarea între eșantioane, de exemplu, separarea marilor pozitivi de eșantioanele pentru teste. Trebuie aplicate norme de control al calității pentru a evita apariția oricărei greșeli, în special de ordin administrativ, în etichetare și în documentație.

Apariția suspectată a unui focar, în sensul articolului 4 alineatul (2) din Directiva 93/85/CEE, implică o reacție pozitivă la testele de diagnostic sau de depistare efectuate pe o probă, după cum se indică în diagrame.

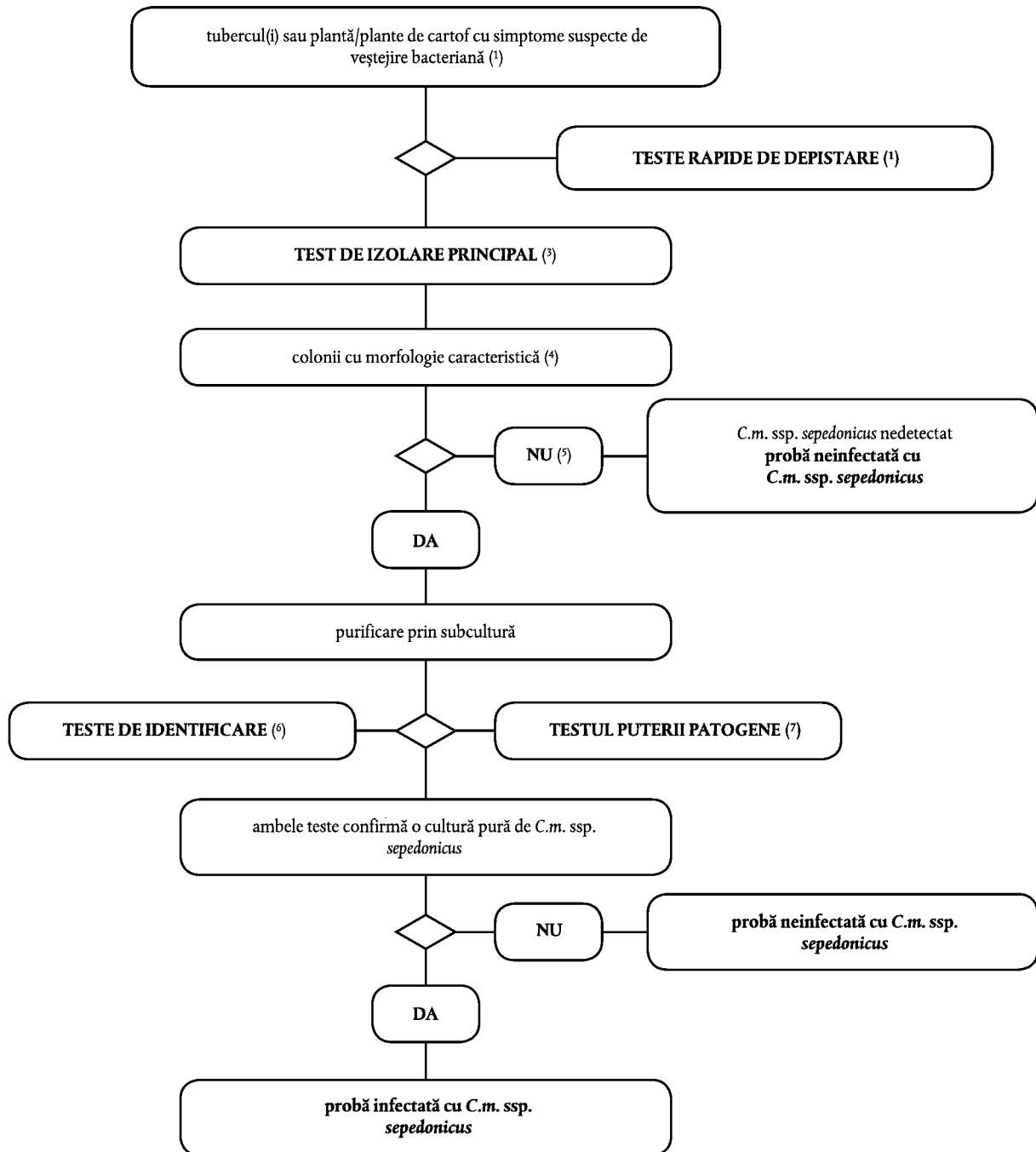
În cazul în care primul test de depistare (IF sau PCR/FISH) este pozitiv, există o suspiciune de contaminare cu *Cms* și trebuie efectuat un al doilea test de depistare. În cazul în care și al doilea test de depistare este pozitiv, suspiciunea este confirmată (aparitiție suspectată) și testele trebuie continuate în conformitate cu protocolul. În cazul în care al doilea test de depistare este negativ, proba este considerată necontaminată cu *Cms*.

Reacția pozitivă la testul de imunofluorescență menționată la articolul 4 alineatul (2) este, așadar, definită ca o reacție pozitivă la testul de imunofluorescență confirmată de un al doilea test de depistare (PCR/FISH).

Prezența confirmată, menționată la articolul 5 alineatul (1) din Directiva 93/85/CEE, implică izolarea și identificarea unei culturi pure de *C. m.* ssp. *sepedonicus* cu confirmarea patogenității.

1. PREZENTAREA DIAGramei Funcționale**1.1. Protocol de detectare în vederea diagnosticării veștejirii bacteriene pe tuberculi și plante de cartof care prezintă simptome ale bolii**

Procedura de testare vizează tuberculii și plantele de cartofi care prezintă simptome caracteristice veștejirii bacteriene sau care prezintă suspiciunea prezenței bolii respective. Procedura prevede un test rapid de depistare, izolarea organismului patogen plecând de la țesutul vascular infectat pe medii de diagnostic și, în cazul unui rezultat pozitiv, identificarea culturii ca fiind *C. m.* ssp. *sepedonicus*.



(1) Descrierea simptomelor figurează în secțiunea 2.

(2) Testele adecvate sunt:
— testul de imunofluorescență (secțiunea 4);
— testul PCR (secțiunea 6);
— testul FISH (secțiunea 5).

(3) Deși izolarea prin dizolvare și însămânțare pe medii de cultură a agentului patogen provenit din materialul vegetal care prezintă simptome caracteristice este o sarcină simplă, punerea în cultură riscă să eșueze începând cu stadiile avansate de infecție. Bacteriile saprofite care se dezvoltă pe un țesut bolnav riscă într-adevăr să se multiplice mult mai repede decât agentul patogen sau să îi inhibe creșterea pe mediul de izolare. Așadar, se recomandă să se utilizeze în același timp medii neselective și selective, de preferință de tip MTNA (secțiunea 8) sau să se recurgă la testul biologic (secțiunea 7).

(4) Profilul morfologic al unei colonii caracteristice este prezentat în secțiunea 8.

(5) Atunci când testul de izolare este negativ, în ciuda existenței simptomelor caracteristice ale bolii, trebuie repetată izolarea.

(6) Se poate identifica în mod viabil o cultură pură de *C.m. ssp. sepedonicus* utilizând testele enumerate în secțiunea 9.

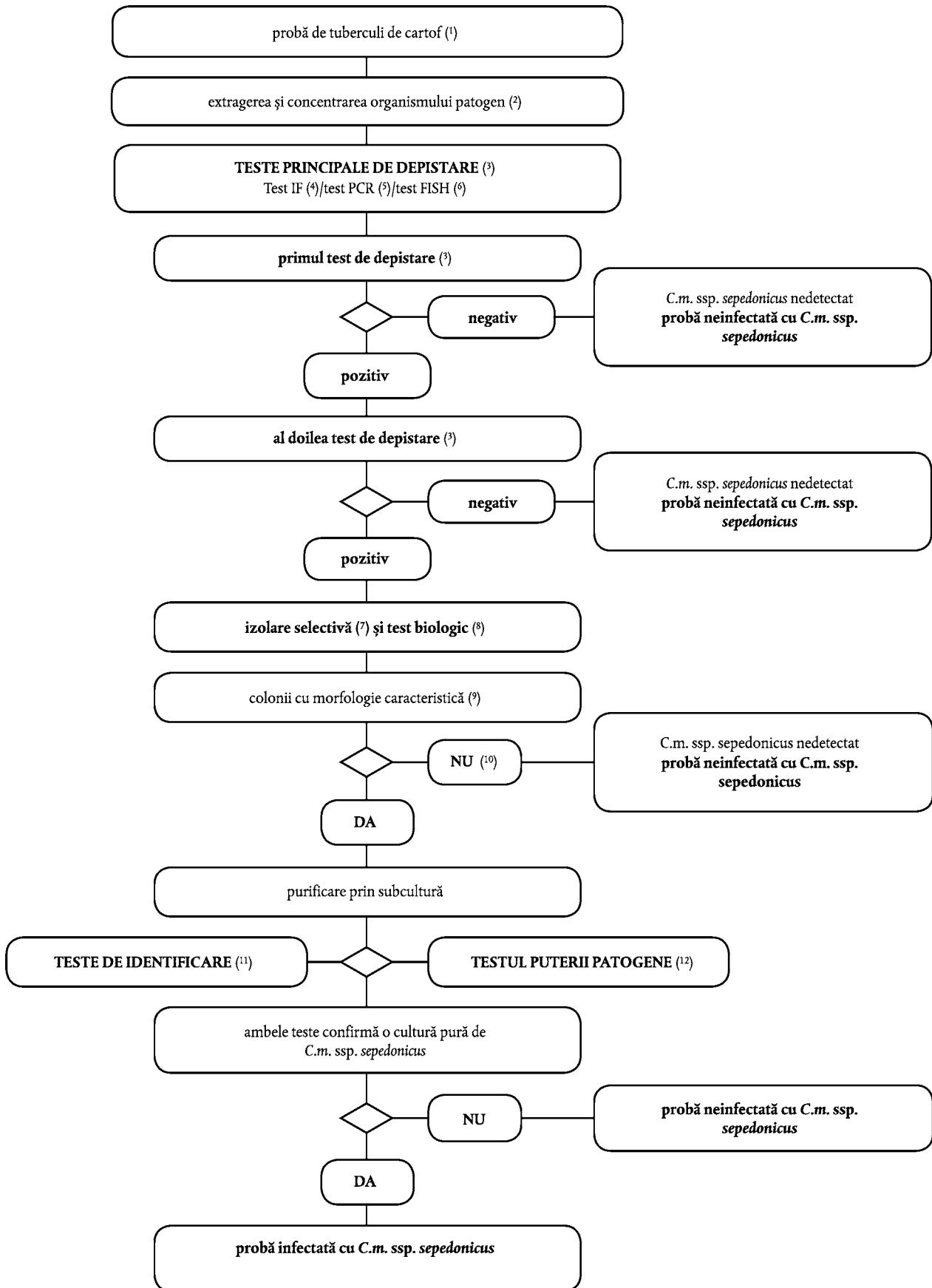
(7) Testul puterii patogene este descris în secțiunea 10.

1.2. **Protocol de detectare și de identificare a *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* pe eșantioane de tuberculi de cartofi asimptomatice**

Principiu

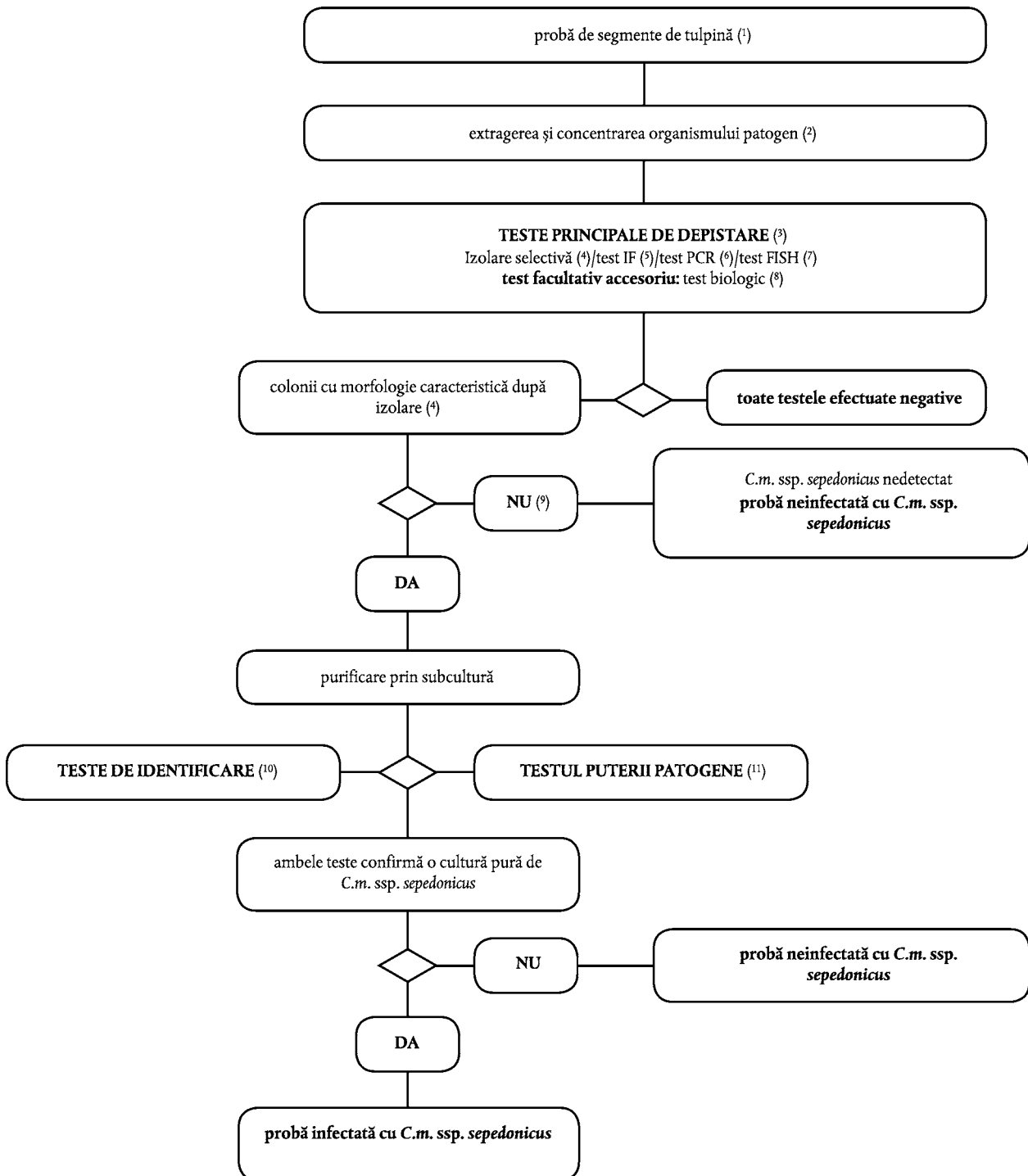
Procedura de testare vizează detectarea infecțiilor latente ale tuberculilor de cartofi. Orice rezultat pozitiv la cel puțin două teste de depistare, bazate pe principii biologice diferite, trebuie completat cu izolarea organismului patogen, urmată, în caz de izolare a coloniilor caracteristice, de confirmarea unei culturi pure ca fiind *C. m. ssp. sepedonicus*. Rezultatul pozitiv al unui singur test de depistare nu este suficient pentru ca proba să fie considerată suspectă.

Testele de depistare și testele de izolare trebuie să permită praguri de detectare cuprinse între 10^3 și 10^4 celule/ml de extract concentrat repus în suspensie, inclus ca martori pozitivi în fiecare serie de teste.



- (¹) Dimensiunea eşantionului standard este de 200 tuberculi, deşi procedura poate fi aplicată şi unor eşantioane mai reduse, în cazul în care nu se dispune de 200 de tuberculi.
- (²) Extragerea organismului patogen şi metodele de concentrare sunt descrise de secţiunea 3.1.
- (³) În cazul în care cel puţin două teste bazate pe principii biologice diferite sunt pozitive, trebuie efectuate izolarea şi confirmarea. Se va realiza cel puţin un test de depistare. În cazul în care testul respectiv este negativ, proba se consideră negativă. În cazul în care testul este pozitiv, trebuie să se efectueze cel puţin un al doilea test de depistare bazat pe principii biologice diferite pentru a verifica primul rezultat pozitiv. În cazul în care al doilea test sau următoarele sunt negative, proba este considerată negativă. În acest caz nu este necesară efectuarea altor teste.
- (⁴) Test de imunofluorescenţă (IF).
Se utilizează întotdeauna un anticorp policlonal pentru testele de imunofluorescenţă. Se poate obţine o specificitate mai mare (a se vedea secţiunea 4), asociind anticorpului menţionat anticorpi monoclonali suplimentari.
- (⁵) Test PCR.
Se utilizează reactivi şi protocoale PCR validate în mod corespunzător (a se vedea secţiunea 6).
- (⁶) Test FISH.
Se utilizează reactivi şi protocoale validate (a se vedea secţiunea 5).
- (⁷) Izolare selectivă.
Asociată cu utilizarea unui mediu MTNA sau NCP-88 şi a unei diluări la 1/100 de extract concentrat repus în suspensie, izolarea selectivă constituie, în numeroase cazuri, o metodă bună de izolare directă a *C.m. ssp. sepedonicus*. Coloniile caracteristice se pot obţine la o perioadă între trei şi zece zile de la însămânţare. Atunci este posibil să se efectueze purificarea şi identificarea agentului patogen. Pentru a profita din plin de posibilităţile oferite de testul în cauză, trebuie să se pregătească cu grijă conurile de cartof prelevate de pe stolon pentru a evita contaminarea cu bacterii secundare legate de tubercul, care constituie organisme concurente ale *C.m. ssp. sepedonicus* pe mediul de cultură şi sunt susceptibile de a înlocui agentul patogen menţionat. În cazul eşuării testului de însămânţare, izolarea trebuie efectuată pe baza plantelor utilizate pentru testul biologic (a se vedea secţiunea 8).
- (⁸) Testul biologic este utilizat pentru izolarea *C.m. ssp. sepedonicus* pe baza extractelor de cartofi prin îmbogăţire selectivă în pătlăgele vinete (*Solanum melongena*). Sunt necesare condiţii optime de incubaţie, în conformitate cu specificaţiile procedurii în cauză. Bacteriile care au efect inhibitor asupra *C.m. ssp. sepedonicus* în prezenţa unui mediu MTNA sau NCP-88 nu riscă să afecteze desfăşurarea testului menţionat (a se vedea secţiunea 7).
- (⁹) Profilul morfologic al unei colonii caracteristice este prezentat în secţiunea 8.
- (¹⁰) Punerea în cultură sau testele biologice prezintă riscul unui eşec din cauza concurenţei sau a efectului inhibitor al bacteriilor saprofite. În cazul în care testele de depistare dau rezultate pozitive, dar testele de izolare sunt negative, trebuie repetate testele de izolare pe acelaşi extract sau cu ajutorul unor noi ţesuturi vasculare prelevate din apropierea stolonului de pe tuberculi tăiaşi provenind din acelaşi eşantion şi, după caz, trebuie testate eşantioane suplimentare.
- (¹¹) Se pot identifica în mod viabil culturi pure de izolaţi presupuşi de *C.m. ssp. sepedonicus* utilizând testele enumerate de secţiunea 9.
- (¹²) Testul puterii patogene este descris de secţiunea 10.

1.3. Protocol de detectare și de identificare a *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* pe eșantioane asimptomatice de plante de cartof



- (¹) A se vedea secțiunea 3.2 pentru dimensiunea recomandată a eșantioanelor.
- (²) Extragerea organismului patogen și metodele de concentrare sunt descrise în secțiunea 3.2.
- (³) În cazul în care cel puțin două teste bazate pe principii biologice diferite sunt pozitive, trebuie efectuate izolarea și confirmarea.
Se realizează cel puțin un test de depistare. În cazul în care testul respectiv este negativ, eșantionul se consideră negativ. În cazul în care testul este pozitiv, trebuie să se efectueze cel puțin un al doilea test de depistare bazat pe principii biologice diferite pentru a verifica primul rezultat pozitiv. În cazul în care al doilea test sau următoarele sunt negative, eșantionul este considerat negativ. În acest caz nu este necesară efectuarea altor teste.
- (⁴) Testul de izolare selectivă și profilul morfologic al unei colonii caracteristice sunt prezentate în secțiunea 8.
- (⁵) Testul IF este descris în secțiunea 4.
- (⁶) Testele PCR sunt descrise în secțiunea 6.
- (⁷) Testul FISH este descris în secțiunea 5.
- (⁸) Testul biologic este descris în secțiunea 7.
- (⁹) Punerea în cultură sau testele biologice prezintă riscul unui eșec din cauza concurenței sau a efectului inhibitor al bacteriilor saprofite. În cazul în care testele de depistare dau rezultate pozitive, dar testele de izolare sunt negative, trebuie repetate testele de izolare și, după caz, trebuie testate eșantioane suplimentare.
- (¹⁰) Se pot identifica în mod viabil culturi pure de izolați presupuși de *C.m. ssp. sepedonicus*, utilizând testele enumerate în secțiunea 9.
- (¹¹) Testul puterii patogene este descris în secțiunea 10.

2. CERCETAREA VIZUALĂ A SIMPTOMELOR VEȘTEJIRII BACTERIENE

2.1. Plante de cartof

În contextul climatic european se întâmplă rareori ca simptomele să fie observate pe teren, iar atunci când este cazul, acest lucru se întâmplă numai la sfârșitul sezonului. De asemenea, se întâmplă adesea ca simptomele să fie mascate de cele ale altor boli, de vătămări mecanice sau îmbătrânire sau să fie confundate cu acestea. Așadar, simptomele pot trece cu ușurință neobservate în momentul inspecției pe teren. Simptomele veștejirii sunt foarte diferite de cele care caracterizează veștejirea bacteriană. În general, prima progresaază într-adevăr lent și se limitează inițial la marginea frunzelor. Frunzele tinere infectate continuă adesea să crească, dar într-o manieră mai puțin evidentă în locurile infectate, ceea ce face ca frunzele respective să aibă forme neregulate. Frunzele atinse de obstrucția țesuturilor vasculare situate mai jos pe tulpină prezintă adesea pete clorotice intercostale de culoare galbenă sau portocalie. Se întâmplă ca foile, frunzele și chiar și tulpinile infectate să moară. Adesea, frunzele și tuberculii scad doar în dimensiuni. Se întâmplă câteodată să se constate o atrofiere a plantelor. Ilustrații colorate ale unor simptome se pot găsi la adresa: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

2.2. Tuberculi de cartofi

Primele simptome sunt, mai ales în apropierea stolonului, un aspect ușor sticlos sau translucid al țesutului, fără înmuiere în jurul sistemului vascular. Inelul vascular poate prezenta, la stolon, o culoare ușor mai închisă decât de obicei. Primele simptome ușor de identificat sunt o culoare gălbuie a inelului vascular și faptul că, în momentul în care se apasă ușor pe tubercul, din vase ies coloane de materie asemănătoare cu brânza. Exsudatul respectiv conține milioane de bacterii. Poate apărea o înnegrire a țesutului vascular. În acest stadiu, bulbul prezintă simptome asemănătoare cu cele ale veștejirii bacteriene la *Ralstonia solanacearum*. Într-o primă fază, simptomele pot să se limiteze la o parte a inelului care nu este neapărat aproape de stolon, înainte de a se răspândi treptat pe tot inelul. Pe măsură ce infecția progresaază, țesuturile vasculare sunt distruse, iar cortexul exterior se poate separa de cortexul interior. În stadiile avansate ale infecției, la suprafața tuberculului apar fisuri cu marginile adesea colorate în roșu brun. În mai multe cazuri observate recent în Europa se constată o putrezire simultană a cortexului central și a inelului vascular, care antrenează o infestare secundară cu găurire internă și necroză. O infestare fungică sau bacteriană secundară poate masca simptomele și poate fi dificil și chiar imposibil să se distingă simptomele avansate ale veștejirii bacteriene de simptomele altor putregaiuri ale tuberculilor. Nu trebuie excluse nici formele asimptomatice. Ilustrații colorate ale unor simptome se pot găsi la adresa: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

3. PREPARAREA EȘANTIONULUI

3.1. Tuberculi de cartof

Nota bene:

- Dimensiunea eșantionului standard este de 200 de tuberculi pe test. O eșantionare mai intensivă implică mai multe teste pe eșantioane de dimensiunea menționată. Un număr mai mare de tuberculi în eșantion va cauza inhibiție sau o interpretare dificilă a rezultatelor. În cazul în care nu se dispune de un număr atât de mare de tuberculi, procedura poate fi aplicată fără dificultate pe eșantioane mai mici de 200 de tuberculi.
- Validarea tuturor metodelor de detectare descrise în continuare se bazează pe teste realizate pe eșantioane de 200 de tuberculi.
- Extractul de cartof descris în continuare mai poate fi utilizat și pentru a detecta prezența bacteriei responsabile de veștejirea bacteriană a cartofului, *Ralstonia solanacearum*.

Pretratament facultativ prealabil la prepararea eșantionului:

Se spală tuberculii, aplicând între eșantioane dezinfectanți (compuși clorurați, atunci când trebuie utilizat testul PCR pentru eliminarea ADN-ului patogen) și detergenți adecvați. Se usucă tuberculii cu aer. Procedura de spălare menționată este utilă (dar nu este neapărat obligatorie) în special pentru eșantioanele care conțin elemente de sol în excident și în cazul în care trebuie efectuat un test PCR sau o procedură de izolare directă.

- 3.1.1. Cu ajutorul unui scalpel sau al unui cuțit pentru legume curat și dezinfectat se cojește fiecare tubercul la nivelul stolonului până la apariția țesutului vascular. Se decupează cu atenție un mic con de țesut vascular la nivelul stolonului, avându-se grijă să se preleveze cât mai puțin țesut nevascular posibil (a se vedea site-ul web accesibil la adresa: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Nota bene:

După caz, se pun deoparte și se testează separat tuberculii care prezintă simptome suspecte de veștejire bacteriană.

În cazul în care se observă simptome suspecte de veștejire bacteriană în momentul prelevării conului de stolon, trebuie să se efectueze o inspecție vizuală a tuberculului, după ce a fost tăiat în apropierea stolonului. Orice tubercul tăiat care prezintă simptome suspecte trebuie suberificat timp de două zile la temperatura mediului ambiant, apoi conservat în carantină (la o temperatură cuprinsă între 4 și 10 °C) până la efectuarea tuturor testelor. Toți tuberculii din eșantion (inclusiv cei care prezintă simptome suspecte) trebuie conservați în conformitate cu anexa II.

- 3.1.2. Se colectează conurile de stolon în recipiente noi de unică folosință care să se poată închide și/sau sigila (în cazul recipientelor refolosite, acestea se vor curăța și dezinfecta integral cu ajutorul compușilor clorurați). Este preferabil ca tratarea conurilor să se efectueze imediat. În caz contrar, conurile se depozitează în recipient, fără a se adăuga tampon și fie se refrigerază pentru o perioadă mai mică de 72 de ore, fie se conservă la temperatura mediului ambiant pentru o perioadă mai scurtă de 24 de ore. Uscarea și suberificarea, precum și dezvoltarea saprofitelor în momentul depozitării conurilor pot împiedica detectarea agentului responsabil de veștejirea bacteriană.
- 3.1.3. Conurile de stolon se tratează în conformitate cu una dintre următoarele proceduri:
- (a) se acoperă stolonii cu o baie de tampon de extracție în cantitate suficientă (în jur de 40 ml) (a se vedea apendicele 3) și se așază într-un agitator rotativ (între 50 și 100 ture/minut) timp de 4 ore, la o temperatură mai mică de 24 °C sau timp de 16-24 de ore, în cazul în care sunt refrigerați
- sau
- (b) se omogenizează stolonii cu ajutorul unei cantități suficiente (în jur de 40 ml) de tampon de extracție (a se vedea apendicele 3) fie într-un mixer (de exemplu, Waring sau Ultra Thurax), fie zdrobindu-l cu un ciocan din cauciuc sau cu un alt dispozitiv de zdrobire potrivit (de exemplu, Homex) într-o pungă de macerare de unică folosință sigilată (de exemplu, de tip Stomacher sau „Bioreba strong guage polietilenă” de 150 mm × 250 mm, sterilizată cu radiații ionizante).

Nota bene:

Există un risc ridicat de contaminări încrucișate ale eșantioanelor, atunci când eșantioanele sunt omogenizate cu mixerul. Se vor lua măsuri de precauție pentru a evita orice vaporizare sau vărsare în timpul procesului de extracție. Se va asigura folosirea unor lame de mixer și a unor vase proaspăt sterilizate pentru fiecare probă. În cazul folosirii testului PCR, se va evita orice transport de ADN în recipientele sau în dispozitivele de zdrobire. În cazul în care se recurge la testul PCR, se recomandă zdrobirea în pungi de unică folosință și utilizarea tuburilor de unică folosință.

- 3.1.4. Se decantează lichidul supernatant. În cazul în care lichidul este prea tulbure, se limpește prin centrifugare la viteză redusă (la maximum 180 g timp de 10 minute, la o temperatură de 4-10 °C) sau prin filtrare în vid (40-100 μm), spălând filtrul cu un tampon de extracție suplimentară (10 ml) (a se vedea apendicele 3).
- 3.1.5. Se concentrează fracțiunea bacteriană prin centrifugare la viteza de 7 000 g timp de 15 minute (sau de 10 000 g timp de 10 minute) la o temperatură cuprinsă între 4 și 10 °C, apoi se elimină lichidul supernatant fără a agita depozitul.
- 3.1.6. Se readuce depozitul în suspensie într-un tampon de 1,5 ml (a se vedea apendicele 3). Se utilizează 500 μl pentru testele de *C. m. ssp. sepedonicus*, 500 μl pentru testele de *Ralstonia solanacearum* și 500 μl ca valoare de referință. Se adaugă glicerol steril la concentrația finală de 10-25 % (în volum) la 500 μl din alicota de referință și la alicota de test rămasă, se agită și se depozitează la o temperatură între -16 și -24 °C (săptămâni) sau între -68 și -86 °C (luni). În timpul testelor, alicotele de test se păstrează la o temperatură de 4-10 °C.

Nu sunt recomandate congelările și dezghețările repetate.

În cazul în care extractul trebuie transportat, se va asigura livrarea în termen de 24-48 de ore într-o ladă frigorifică.

- 3.1.7. Pentru a evita contaminarea, este necesar ca toți martorii pozitivi și toate eșantioanele de *C. m. ssp. sepedonicus* să fie tratate separat, atât pentru testele de imunofluorescență, cât și pentru toate celelalte teste.

3.2. Plante de cartofi

Nota bene:

Pentru a detecta populațiile recente de *C. m. ssp. sepedonicus* este recomandabil să se testeze probe compozite. Procedura poate fi aplicată cu ușurință pentru probele compozite care conțin până la 200 de părți de tulpini. (Atunci când se efectuează anchete, anchetele respective trebuie să se bazeze pe un eșantion reprezentativ din punct de vedere statistic al populației vegetale examinate).

- 3.2.1. Cu ajutorul unui cuțit sau al unei foarfeci de grădină curate și dezinfectate se taie un segment de unu-doi centimetri de la baza fiecărei tulpini, chiar deasupra solului.

După ce s-au dezinfectat rapid cu etanol de 70 %, segmentele de tulpini se usucă de îndată cu hârtie de filtru.

Se colectează segmentele de tulpini într-un recipient steril închis, respectând procedura de eșantionare expusă în continuare.

3.2.2. Segmentele de tulpini se tratează urmând una dintre următoarele proceduri:

(a) se acoperă segmentele de tulpină cu o baie de tampon de extracție în cantitate suficientă (în jur de 40 ml) (a se vedea apendicele 3) și se așază într-un agitator rotativ (între 50 și 100 ture/minut) timp de 4 ore, la o temperatură mai mică de 24 °C sau timp de 16-24 de ore, în cazul în care sunt refrigerate

sau

(b) segmentele se zdrobesc imediat într-o pungă de macerare rezistentă (de exemplu, Stomacher sau Bioreba) cu o cantitate adecvată de tampon de extracție (a se vedea apendicele 3), folosind un ciocan de cauciuc sau un alt dispozitiv de zdrobire corespunzător (de exemplu, Homex). În caz contrar, segmentele trebuie să fie refrigerate (pentru o perioadă mai scurtă de 72 de ore), fie conservate la temperatura mediului ambiant (pentru o perioadă mai scurtă de 24 de ore).

3.2.3. După o sedimentare de 15 minute, se decantează lichidul supernatant.

3.2.4. De obicei, nu este necesar să se efectueze o nouă limpezire a extractului sau a concentrației fracțiunii bacteriene; cu toate acestea, limpezirea se poate efectua prin filtrare și/sau centrifugare, în conformitate cu metoda descrisă de secțiunile 3.1.4.-3.1.6.

3.2.5. Se separă extractul de probă inițial sau concentrat în două părți egale. Una dintre părți se menține pe toată durata testului la o temperatură de 4-10 °C, iar cealaltă se depozitează la o temperatură între -16 și -24 °C (săptămâni) sau între -68 și -86 °C (luni), după ce s-a introdus în ea în prealabil o cantitate de 10-25 % glicerol steril, în cazul în care va fi necesară efectuarea unui al doilea test.

4. TEST DE IMUNOFLUORESCENȚĂ

Principiu

Ținând seama de capacitatea sa recunoscută de a atinge pragurile cerute, se recomandă utilizarea testului de imunofluorescență ca principal test de depistare.

În cazul în care testul de imunofluorescență este utilizat ca principal test de depistare și rezultatul său este unul pozitiv, trebuie să se efectueze un test PCR sau FISH ca test secundar. În cazul în care testul de imunofluorescență este folosit ca test secundar, iar rezultatul său este pozitiv, analiza trebuie completată cu teste suplimentare, în conformitate cu indicațiile din diagrama funcțională.

Nota bene:

Atunci când testul de imunofluorescență se utilizează ca test principal, se folosește întotdeauna un anticorp policlonal. Atunci când un test de imunofluorescență efectuat cu un anticorp policlonal are un rezultat pozitiv, un test suplimentar al probei cu anticorp monoclonal poate permite o specificitate mai mare, dar, de asemenea, se poate dovedi mai puțin evident.

Trebuie să se folosească anticorpii unei sușe de referință a *C. m. ssp. sepedonicus*. Se recomandă să se determine titrul pentru fiecare nou lot de anticorpi. Titrul se definește ca fiind cea mai înaltă diluție la care se obține o reacție optimă, atunci când se testează o suspensie care conține între 10^5 și 10^6 celule pe mililitru, a unei sușe omoloage de *C. m. ssp. sepedonicus* folosind un conjugat adecvat de izotiocianat de fluoresceină (FITC), în conformitate cu recomandările producătorului. Soluția brută de anticorpi policlonali sau monoclonali trebuie să prezinte un titru de imunofluorescență de cel puțin 1:2 000. În momentul efectuării testului, diluția/diluțiile de lucru ale anticorpilor trebuie să fie aproximativ egale cu jumătatea titrului. Se folosesc anticorpi validați (a se vedea site-ul web la adresa: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Testul trebuie efectuat pe extracte de probă proaspăt preparate. După caz, acesta poate fi efectuat cu succes pe extracte conservate în soluție de glicerol, la o temperatură între -68 și -86 °C. Glicerolul poate fi separat de probă prin adăugarea unui ml de tampon de extract concentrat (a se vedea apendicele 4), centrifugare timp de 15 minute la 7 000 g și resuspendare în aceeași cantitate de tampon de extract concentrat. Acest lucru este rareori necesar, în special atunci când proba este fixată de lamă prin flambare (a se vedea punctul 2.2).

Se pregătesc lame martori pozitivi distincți ai unei sușe omoloage sau ai oricărei alte sușe de referință a *C. m. ssp. sepedonicus* într-o suspensie de extract de cartof, astfel cum se indică în apendicele 2 și, eventual, într-o soluție tampon.

Ca martor similar pe aceeași lamă ar trebui utilizat, în măsura posibilului, țesut infectat în mod natural (conservat prin liofilizare sau congelare între -16 °C și -24 °C).

Ca martori negativi se folosesc alicote de extract de probă care au dat, în prealabil, un rezultat negativ la teste.

Se utilizează lame de microscop cu multe godeuri dotate, de preferință, cu 10 ferestre cu un diametru minim de 6 mm.

Materialul de control se testează la fel ca probele.

4.1. Lamele se prepară folosind una dintre următoarele metode:

(i) extracte finale cu conținut relativ redus de amidon:

se depune cu pipeta pe prima fereastră o cantitate standard (15 μ l sunt suficienți pentru un diametru al ferestrei de 6 mm; pentru ferestrele cu un diametru mai mare se alege o cantitate mai mare) dintr-o soluție de 1/100 de extract concentrat de cartof repus în suspensie. Apoi se depune cu pipeta o cantitate similară de extract concentrat nediluat (1/1) pe ferestrele rămase din acel șir. Șirul următor poate fi folosit ca duplicat sau poate servi pentru o a doua probă, astfel cum se indică în figura 1;

(ii) alte extracte:

se prepară diluțiile zecimale (la 1/10, la 1/100 și la 1/1 000) din extractul concentrat repus în suspensie în soluția tampon. Se depune cu pipeta pe un șir de ferestre o cantitate standard (15 μ l sunt suficienți pentru un diametru al ferestrei de 6 mm; pentru ferestrele cu un diametru mai mare se alege o cantitate mai mare) de suspensie de extract pur și de fiecare diluție. Șirul următor poate fi folosit ca duplicat sau poate servi pentru o a doua probă, astfel cum se indică în figura 2.

4.2. Se usucă picăturile la temperatura mediului ambiant sau prin încălzire la temperaturi cuprinse între 40 °C și 45 °C. Celulele bacteriene se fixează pe lamă prin încălzire (15 minute la 60 °C), prin flambare, cu ajutorul etanolului la 95 % sau urmând instrucțiunile specifice ale furnizorilor de anticorpi.

În cazul în care este necesar, lamele fixe pot fi refrigerate și depozitate într-o cutie de desicație pentru cea mai scurtă perioadă posibilă (maximum 3 luni) înainte de efectuarea unui alt test.

4.3. Procedura testului de imunofluorescență:

(i) în conformitate cu metoda de preparare a lamelor de test, indicată la punctul 4.1 (i):

se prepară o serie de diluții pe jumătate de anticorp într-un tampon de imunofluorescență. Primul godeu trebuie să primească 1/2 din titru (T/2), celelalte 1/4 din titru (T/4), 1/2 din titru (T/2), titrul (T) și de două ori titrul (2T);

(ii) în conformitate cu metoda de preparare a lamelor de test, indicată la punctul 4.1 (ii):

se prepară diluția de lucru de anticorp într-un tampon de imunofluorescență. Diluția de lucru are efect asupra specificității.

Figura 1. Prepararea lamei de test în conformitate cu punctele 4.1 (i) și 4.3 (i)

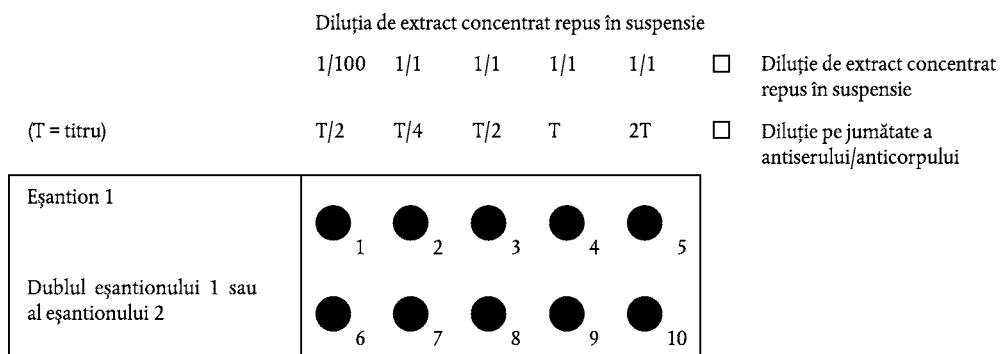
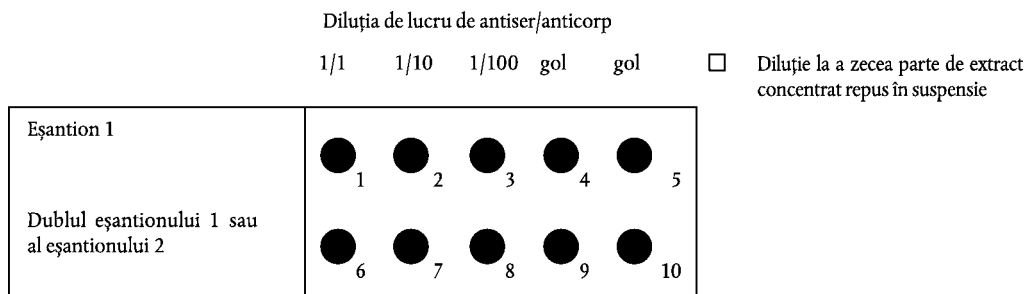


Figura 2. Prepararea lamei de test în conformitate cu punctele 4.1 (ii) și 4.3 (ii)



4.3.1. Se aşază lamele pe hârtie umedă. Se acoperă complet fiecare fereastră de test cu una sau mai multe diluții de anticorpi. Cantitatea de anticorpi aplicată pe fiecare fereastră trebuie să fie cel puțin egală cu volumul de extract aplicat.

În absența instrucțiunilor specifice ale furnizorilor de anticorpi, se aplică următoarea procedură:

4.3.2. se incubează lamele pe hârtie umedă și sub un capac-clopot timp de 30 de minute, la temperatura mediului ambiant (18-25 °C);

4.3.3. se elimină picăturile de pe fiecare lamă și se clătește cu grijă într-o soluție tampon pentru imunofluorescență. Se spală prin imersie timp de cinci minute într-o soluție tampon IF-Tween (a se vedea apendicele 3), apoi încă cinci minute într-o soluție tampon IF. Se evită orice vaporizare sau vărsare care ar putea determina o contaminare încrucișată. Se elimină cu atenție excesul de umiditate cu ajutorul hârtiei sugative;

4.3.4. se aşază lamele pe hârtie umedă. Se acoperă ferestrele de test cu conjugat FITC la diluția utilizată la titrare. Cantitatea de conjugat aplicată pe ferestre trebuie să fie identică cu cantitatea de anticorpi utilizată;

4.3.5. se incubează lamele pe hârtie umedă și sub capac-clopot timp de 30 de minute, la temperatura mediului ambiant (18-25 °C);

4.3.6. se elimină de pe lamă picăturile de conjugat. Se clătește și se spală în conformitate cu indicațiile anterioare (punctul 4.3.3).

Se elimină cu grijă excesul de umiditate;

4.3.7. în fiecare fereastră se depun cu pipeta 5-10 µl dintr-o soluție de glicerol tamponată cu fosfat la 0,1 M (a se vedea apendicele 3) sau un suport antidecolorare din comerț, apoi se acoperă cu o lamelă.

4.4. Citirea testului de imunofluorescență:

4.4.1. Se examinează lamele de test cu ajutorul unui microscop cu epifluorescență și cu ajutorul filtrelor adaptate la excitația izotiocianatului de fluorescență, în imersie în ulei sau în apă și cu o creștere de la 500 la 1 000. Se examinează ferestrele în funcție de două diametre perpendiculare și în jurul perimetrului. Pentru probele care nu prezintă celule sau care prezintă doar un număr redus de celule se observă cel puțin 40 de câmpuri microscopice.

Se începe prin a se controla lama martorului pozitiv. Celulele trebuie să prezinte o fluorescență vie și să fie complet colorate la titrul de anticorp sau de diluție de lucru determinat. În cazul unei colorări anormale, testul IF (secțiunea 4) trebuie repetat.

4.4.2. Se caută în ferestrele lamelor de test prezența celulelor care prezintă o fluorescență vie și o morfologie caracteristică pentru *C. m. ssp. sepedonicus* (a se vedea site-ul web <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Intensitatea fluorescenței trebuie să fie echivalentă cu cea a sușei martor pozitiv pentru o diluție identică de anticorpi. Celulele a căror colorare este incompletă sau care prezintă o fluorescență slabă nu trebuie luate în considerare.

La cea mai mică suspiciune de contaminare, testul trebuie repetat. Acest lucru se poate întâmpla în cazul în care toate lamele dintr-un lot prezintă celule pozitive din cauza contaminării tamponului sau în cazul în care celulele pozitive sunt izolate (în exteriorul ferestrelor) pe mediul de montare al lamei.

4.4.3. Există un anumit număr de probleme inerente specificității testului de imunofluorescență. Există un risc ridicat ca în extractele de conuri de stolonii și de segmente de tulpini de cartof să apară populații nedorite de celule fluorescente, atipice din punct de vedere morfologic și populații de bacterii saprofite care provoacă reacții încrucișate și au dimensiune și morfologie similare cu *C. m. ssp. sepedonicus*.

4.4.4. Numai celulele fluorescente care au o dimensiune și o morfologie caracteristice titrului sau diluției de lucru a anticorpilor menționați la punctul 4.3 trebuie să fie luate în considerare.

4.4.5. Interpretarea testului de imunofluorescență:

(i) În cazul în care proba conține celule care prezintă o fluorescență vie și o morfologie caracteristică, se evaluează numărul mediu de celule caracteristice pe câmp microscopic și se calculează numărul celulelor menționate pe mililitru de extract concentrat repus în suspensie (a se vedea apendicele 4).

Testul de imunofluorescență este considerat pozitiv atunci când eșantionul conține cel puțin 5×10^3 celule caracteristice pe mililitru de extract concentrat repus în suspensie. În acest caz, eșantionul este considerat ca fiind potențial contaminat și trebuie continuate testele.

(ii) Testul de imunofluorescență este considerat negativ atunci când eșantionul conține mai puțin de 5×10^3 celule pe mililitru de extract concentrat repus în suspensie și proba este considerată necontaminată. Nu este necesară continuarea testelor.

5. TESTUL FISH

Principiu

În cazul în care testul FISH este folosit ca test de depistare inițial și rezultatul său este pozitiv, trebuie să se efectueze un test de imunofluorescență ca al doilea test obligatoriu de depistare. În cazul în care testul FISH este folosit ca test secundar, iar rezultatul său este pozitiv, diagnosticul trebuie completat de teste suplimentare, astfel cum se indică în diagrama funcțională.

Nota bene:

Se utilizează oligosonde validate specifice *C. m. ssp. sepedonicus* (a se vedea apendicele 7). Testele preliminare efectuate prin această metodă trebuie să permită detectarea reproductibilă a cel puțin 10^3 - 10^4 celule/ml de *C. m. ssp. sepedonicus* adăugate extractelor de probe care au dus anterior la rezultate negative.

Este preferabil să se aplice procedura descrisă în continuare pentru extractele de probă proaspăt preparate, dar procedura poate funcționa, de asemenea, cu extracte de probă conservate în soluție de glicerol la temperaturi între -16°C și -24°C sau între -68°C și -86°C .

Ca martori negativi se folosesc alicote de extract de probă care au dus în prealabil la un rezultat negativ, cu ocazia testelor de depistare a *C. m. ssp. sepedonicus*.

Ca martori pozitivi se prepară suspensii care conțin între 10^5 și 10^6 celule/ml de *C. m. ssp. sepedonicus* (sușe NCPPB 4053 sau PD 406, de exemplu) într-o soluție tampon fosfatată la 0,01 M, pe baza unei culturi de trei până la cinci zile (a se vedea apendicele 2 pentru preparare). Se prepară lame martori pozitivi distincte ale sușei omoloage sau ale oricărei alte sușe de referință de *C. m. ssp. sepedonicus* într-o suspensie de extract de cartof, astfel cum se indică în apendicele 2.

Utilizarea unei oligosonde eubacteriene marcate cu izotiocianat de fluoresceină (FITC) permite controlarea procesului de hibridizare, colorând toate eubacteriile prezente în probă.

Materialul de control se testează la fel ca și probele.

5.1. **Fixarea extractului de cartof**

Protocolul prezentat în cele ce urmează se bazează pe Wullings *et al.* (1998).

5.1.1. Se prepară soluția de fixare (a se vedea apendicele 7).

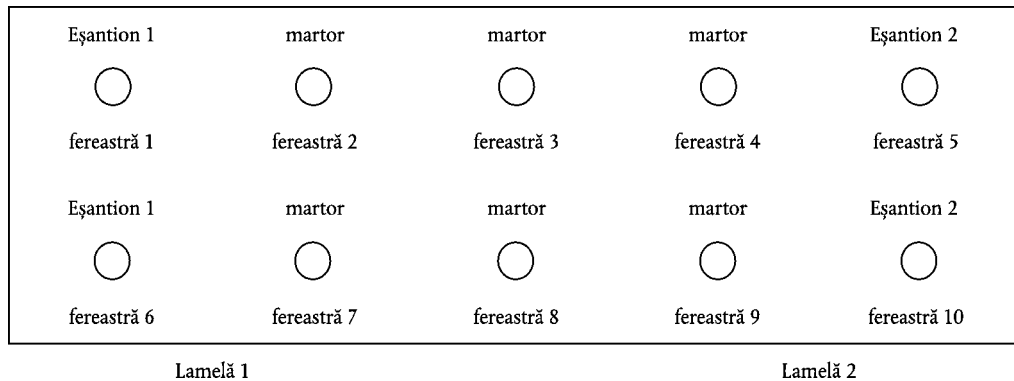
5.1.2. Se introduc cu pipeta 100 μl din fiecare extract într-un tub Eppendorf și sunt centrifugați timp de 8 minute la 7 000 g.

5.1.3. Se elimină lichidul supernatant și se dizolvă extractul concentrat în 500 μl de fixativ preparat cu mai puțin de 24 de ore înainte. Se agită și se lasă la incubat toată noaptea la 4°C .

Se mai poate utiliza ca fixativ etanol la 96 %. În acest caz, extractul concentrat menționat la punctul 5.1.2 se dizolvă într-un amestec format din 50 μl de tampon fosfatat la 0,01 M și din 50 μl etanol la 96 %. Se amestecă la vortex și se lasă la incubat la 4°C timp de 30-60 minute.

- 5.1.4. Se pune la centrifugat timp de 8 minute la 7 000 g, se elimină lichidul supernatant și se repune în suspensie extractul concentrat în 75 μ l de tampon fosfatat la 0,01 M.
- 5.1.5. Se depun 16 μ l de suspensii fixate pe o lamă multitest, astfel cum se indică în figura 3. Pe fiecare lamă se aplică două probe diferite, nediluate, și din acestea se diluează 10 μ l la 1:100 (într-un tampon fosfatat de 0,01 M). Restul soluției de probă (49 μ l) poate fi conservată la -20 °C, după ce s-a adăugat o cantitate de etanol la 96 %. În cazul în care este necesară repetarea testului FISH, se elimină etanolul prin centrifugare și se înlocuiește cu o cantitate echivalentă de tampon fosfatat la 0,01 M (se omogenizează prin agitare).

Figura 3. Dispunerea unei lame pentru testul FISH



- 5.1.6. Lamele se usucă la aer (sau într-un uscător, la 37 °C), apoi se fixează prin flambare.
- În acest stadiu procedura poate fi întreruptă, iar hibridizarea poate continua în ziua următoare. Lamele trebuie depozitate la adăpost de praf, într-un loc uscat și la temperatura mediului ambiant.
- 5.2. **Prehibridizare și hibridizare**
- 5.2.1. Se prepară o soluție de lizozimă având la bază 10 mg de lizozimă (Sigma L-6876) pentru 10 ml de tampon (100 mM Tri-HCl, 50 mM EDTA, pH 8,0). Soluția menționată poate fi conservată, dar nu trebuie congelată, nici dezghețată, decât o singură dată. Fiecare eșantion se acoperă integral cu aproximativ 50 μ l de soluție de lizozimă și se lasă la incubat timp de 10 minute la temperatura aerului ambiant, apoi lamele se scufundă o singură dată în apa demineralizată și se usucă cu hârtie de filtru.
- O altă posibilitate: în fiecare godeu, în locul lizozimei, se adaugă la tamponul (2mM Tri-HCl, 2mM CaCl₂, pH 7,4) 50 μ l de proteinază K la 40-400 μ g/ml, apoi se lasă la incubat la 37 °C timp de 30 de minute.
- 5.2.2. Se deshidratează celulele prin băi succesive de etanol la 50 %, 80 % și 96 % de un minut fiecare. Se așază lamele pe un suport și se lasă să se usuce în aer liber.
- 5.2.3. Se prepară o cameră de incubație umedă tapițând fundul unei cutii ermetice de hârtie de filtru umedă sau de hârtie de filtru impregnată cu hibmix 1x (a se vedea apendicele 7). Se pune la preincubat cutia timp de cel puțin 10 minute în cuptorul de hibridizare, la o temperatură de 55 °C.
- 5.2.4. Se prepară soluția de hibridizare (a se vedea apendicele 7) având la bază 45 μ l pe lamă, apoi se pune la preincubat timp de cinci minute la o temperatură de 55 °C.
- 5.2.5. Se așază lamele pe o placă încălzită la 45 °C și se varsă 10 μ l de soluție de hibridizare în fiecare dintre cele patru godeuri ale fiecărei lame.
- 5.2.6. Se acoperă fiecare lamă cu două lamele (24 × 24 mm), avându-se grijă să nu se prindă aer, apoi se așază lamele în camera de hibridizare umedă preîncălzită și se lasă acolo o noapte, în obscuritate și la o temperatură de 55 °C, pentru a permite desfășurarea hibridizării.
- 5.2.7. Se prepară trei pahare de laborator care conțin 1 l de apă ultrapură, 1 l de hibmix 1x (334 ml de hibmix 3x și 666 ml de apă ultrapură) și 1 l de hibmix 1/2x (167 ml de hibmix 3x și 833 ml de apă ultrapură). Fiecare dintre pahare se pune la preincubat în baie de aburi, la o temperatură de 55 °C.
- 5.2.8. Lamele și lamelele se îndepărtează și se așază pe un suport.
- 5.2.9. Se elimină excesul de sondă, punându-l la incubat timp de 15 minute la 55 °C în paharul de laborator care conține hibmixul 1x.

5.2.10. Se transferă suportul de lame într-o soluție de spălat cu hibmix ½ și se lasă la incubat timp de încă 15 minute.

5.2.11. Se scufundă rapid lamele într-o baie de apă ultrapură și se usucă cu hârtie de filtru. Se elimină excesul de umiditate așezând ușor hârtia de filtru peste suprafața care trebuie uscată. Se pun cu pipeta în fiecare fereastră între 5 și 10 μl de soluție suport antidecolorare (de exemplu, Vectashield de la Vecta Laboratories, CA, USA sau o soluție echivalentă) și se acoperă întreaga suprafață a lamei cu o lamelă mare (24 × 60 mm).

5.3. Citirea testului FISH

5.3.1. Se trece de îndată la observarea lamelor cu ajutorul unui microscop cu epifluorescență care mărește între 630 și 1 000 x, sub o peliculă de ulei. Cu un filtru adaptat la izotiocianatul de fluoresceină (FITC), celulele eubacteriene (inclusiv majoritatea celulelor gram-negative) prezente în probă se colorează în verde fluorescent. Cu un filtru adaptat la tetrametilrodamină-5-izotiocianat, celulele de *C. m. ssp. sepedonicus* marcate cu Cy3 apar colorate în roșu fluorescent. Se compară morfologia celulelor cu cea a martorilor pozitivi. Celulele trebuie să fie complet colorate și să prezinte o fluorescență vie. În caz de colorare anormală, testul FISH (secțiunea 9.4) trebuie repetat. Se examinează ferestrele pe baza a două diametre perpendiculare și în jurul perimetrului. Pentru probele care nu prezintă celule sau care prezintă doar un număr redus de celule se observă cel puțin 40 de câmpuri microscopice.

5.3.2. Se caută în ferestrele lamelor de test prezența celulelor care prezintă o fluorescență vie și o morfologie caracteristică pentru *C. m. ssp. sepedonicus* (a se vedea site-ul web <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Intensitatea fluorescenței trebuie să fie echivalentă cu cea a sușei martor pozitiv sau superioară acesteia. Celulele a căror colorare este incompletă sau care prezintă o fluorescență slabă nu trebuie luate în considerare.

5.3.3. La cea mai mică suspiciune de contaminare, testul trebuie repetat. Acest lucru se poate întâmpla în cazul în care toate lamele dintr-un lot prezintă celule pozitive din cauza contaminării tamponului sau în cazul în care celulele pozitive sunt izolate (în exteriorul ferestrelor) pe mediul de montare al lamei.

5.3.4. Există un anumit număr de probleme inerente specificității testului FISH. Este posibil ca în extractele de conuri de stoloni și de segmente de tulpini de cartofi să apară populații nedorite de celule fluorescente morfologic atipice și de bacterii saprofite care provoacă reacții încrucișate și au mărimea și morfologia asemănătoare cu *C. m. ssp. sepedonicus*. Fenomenul menționat este, cu toate acestea, mult mai puțin frecvent decât în cazul testului de imunofluorescență.

5.3.5. Doar celulele fluorescente de mărime și cu morfologie caracteristice trebuie luate în considerare (a se vedea punctul 5.3.2).

5.3.6. Interpretarea rezultatului testului FISH:

- (i) rezultatele testului FISH sunt valabile atunci când prin intermediul filtrului FITC se observă celule care prezintă o fluorescență vie de culoare verde și o mărime și o morfologie caracteristice pentru *C. m. ssp. sepedonicus*, iar prin intermediul filtrului rodamină se observă celule care prezintă o fluorescență vie de culoare roșie la toți martorii pozitivi și la nici un martor negativ. În cazul în care proba conține celule care prezintă o fluorescență vie și o morfologie caracteristică, se evaluează numărul mediu de celule caracteristice pe câmp microscopic și se calculează numărul celulelor respective pe mililitru de extract concentrat repus în suspensie (a se vedea apendicele 4). Probele care conțin cel puțin 5×10^3 celule caracteristice pe mililitru de extract concentrat repus în suspensie sunt considerate ca fiind potențial contaminate. Trebuie continuate testele. Eșantioanele care conțin mai puțin de 5×10^3 celule caracteristice pe mililitru de extract concentrat repus în suspensie sunt considerate ca fiind negative;
- (ii) testul FISH este negativ în cazul în care nu se observă, prin intermediul filtrului rodamină, celule de mărimea și cu morfologia caracteristice pentru *C. m. ssp. sepedonicus* care prezintă o fluorescență vie de culoare roșie, cu condiția ca astfel de celule caracteristice cu o fluorescență vie și de culoare roșie să fie observate cu filtrul rodamină în preparatele de martori pozitivi.

6. TESTUL PCR

Principii

În cazul în care testul PCR este folosit ca test principal de depistare și rezultatul său este pozitiv, trebuie să se efectueze un test de imunofluorescență ca test secundar de depistare obligatoriu. În cazul în care testul PCR este folosit ca test secundar, iar rezultatul său este pozitiv, diagnosticul trebuie completat de teste suplimentare, astfel cum se indică în diagrama funcțională.

Exploatarea completă a metodei menționate ca test de depistare principal nu se recomandă decât în cazul în care există o expertiză specializată în domeniu.

Nota bene:

Tetele preliminarilor efectuate în conformitate cu această metodă trebuie să permită detectarea reproductibilă a 10^3 - 10^4 celule/ml de *C. m. ssp. sepedonicus* adăugate extractelor de probe care au dat anterior rezultate negative. Se pot dovedi necesare experiențe de optimizare pentru a obține niveluri maxime de sensibilitate și de specificitate în toate laboratoarele.

Se folosesc reactivi și protocoale PCR validate. Se alege, de preferință, o metodă cu control intern.

Se iau precauțiile necesare pentru a evita contaminarea probei cu ADN-ul țintă. Pentru a reduce pe cât posibil riscul contaminării cu ADN-ul țintă, ar trebui ca testul PCR să fie efectuat de către tehnicienii experimentați, în laboratoare de biologie moleculară specializate.

Martorii negativi (în ceea ce privește procedurile PCR și de extragere a ADN-ului) trebuie tratați întotdeauna ca probe finale în procedură, pentru a evidenția apariția unui eventual transfer de ADN.

În testul PCR trebuie incluși următorii martori negativi:

- extract de probă care a dat anterior rezultate negative pentru *C. m. ssp. sepedonicus*;
- tampoane martori folosite pentru a extrage bacteria și ADN-ul din probă;
- amestec reactiv pentru PCR.

De asemenea, trebuie incluși aici și următorii martori pozitivi:

- alicote de extracte finale repuse în suspensie, după ce s-a adăugat *C. m. ssp. sepedonicus* (a se vedea apendicele 2 pentru preparare);
- suspensie în mediu apos de 10^6 celule pe mililitru dintr-un izolat virulent de *C. m. ssp. sepedonicus* (de exemplu, NCPPB 2140 sau NCPPB 4053);
- de asemenea, în cazul în care este posibil, pentru testul PCR se utilizează ADN extras din probe de martori pozitivi.

Pentru a evita riscurile de contaminare, martorii pozitivi se prepară într-un mediu diferit de cel în care se găsesc probele care trebuie testate.

În măsura posibilului, extractele de probe trebuie curățate de pământ. În anumite cazuri, este recomandabil să se prepare extracte de cartofi spălați, în cazul în care se prevede folosirea protocoalelor PCR.

6.1. Metode de purificare a ADN-ului

Se folosesc probe martori pozitivi și negativi, în conformitate cu metoda descrisă anterior.

Materialul de control se prepară la fel ca și probele.

Există o serie întreagă de metode pentru purificarea ADN-ului țintă, în cazul substratelor de probe complexe, pentru a elimina inhibitorii PCR și alte reacții enzimatică și a concentra ADN-ul țintă în extractul de probă.

Următoarea metodă a fost optimizată pentru a fi utilizată cu metoda PCR validată, descrisă de apendicele 6.

6.1.(a) Metoda Pastrik (2000)

1. Se pun cu pipeta 220 μ l de tampon de liză (100 mM NaCl, 10mM Tri-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0] într-un tub Eppendorf de 1,5 ml.
2. Se adaugă 100 μ l de extract de probă și se așază într-un bloc de încălzire sau într-o baie de aburi la 95 °C timp de zece minute.
3. Se așază tubul pe gheață timp de cinci minute.
4. Se adaugă 80 μ l de soluție concentrată de lizozimă (50 mg de lizozimă pe mililitru în 10 mM Tri HCl, pH 8,0) și se lasă la incubat la 37 °C timp de 30 de minute.
5. Se adaugă 220 μ l de Easy DNA[®] soluție A (Invitrogen), se omogenizează bine prin agitare și se lasă la incubat la 65 °C timp de 30 de minute.

6. Se adaugă 100 µl de Easy DNA[®] soluție B (Invitrogen), se omogenizează bine prin agitare până când precipitatul circulă liber în tub, iar proba prezintă o viscozitate uniformă.
7. Se adaugă 500 µl de cloroform și se omogenizează prin agitare până când viscozitatea scade, iar amestecul devine omogen.
8. Se centrifughează la 15 000 g timp de 20 de minute, la 4 °C, pentru a separa fazele și a forma interfaza.
9. Se varsă faza superioară într-un alt tub Eppendorf.
10. Se adaugă 1 mililitru de etanol la 100 % (-20 °C), se omogenizează rapid prin agitare și se lasă la incubat pe gheață timp de 10 minute.
11. Se centrifughează la 15 000 g timp de 20 de minute la 4 °C și se elimină etanolul din extractul concentrat.
12. Se adaugă 500 µl de etanol la 80 % (-20 °C) și se amestecă, răsturnând tubul.
13. Se centrifughează la 15 000 g timp de 10 minute la 4 °C, se conservă extractul concentrat și se elimină etanolul.
14. Se lasă să se usuce extractul în aer liber sau într-un Speed Vac de ADN.
15. Se repune în suspensie extractul în concentrat în 100 µl de apă ultrapură sterilă și se lasă la temperatura mediului înconjurător timp de cel puțin 20 de minute.
16. Se conservă la -20 °C până atunci când se utilizează pentru PCR.
17. Se izolează orice precipitat alb prin centrifugare și se utilizează 5 µl din lichidul supernatant ce conține ADN pentru PCR.

6.1.(b) Alte metode

Se pot aplica și alte metode de extragere a ADN-ului (Qiagen DNeasy Plant Kit, de exemplu), cu condiția ca metodele respective să aibă o eficacitate recunoscută ca fiind echivalentă, pentru purificarea ADN-ului provenit din probele martori care conțin între 10^3 și 10^4 celule de agent patogen pe mililitru.

6.2. PCR

- 6.2.1. Se prepară matricele de test și de control pentru PCR, urmând protocoalele validate (a se vedea apendicele 6). Se prepară o diluție zecimală din extractul de ADN provenit din probă (1:10 în apă ultrapură).
- 6.2.2. Se prepară amestecul reactiv pentru PCR într-un mediu lipsit de orice contaminare, în conformitate cu protocoalele publicate (a se vedea apendicele 6). Protocolul PCR validat este o reacție multiplex care include și un control PCR intern.
- 6.2.3. Se adaugă 5 µl de extract de ADN la 25 µl reactiv PCR, în tuburi PCR sterile.
- 6.2.4. Se constituie o probă martor negativ care nu conține decât amestecul reactiv pentru PCR și se adaugă în locul probei o apă pură provenind din aceeași sursă ca și cea utilizată în amestecul PCR.
- 6.2.5. Se așază tuburile în același termociclu folosit la testul preliminar și se lansează programul PCR optimizat în mod corespunzător (a se vedea apendicele 6).

6.3. Analiza produsului reacției PCR

- 6.3.1. Se decodează amplimerii prin electroforeză pe gel de agaroză. O cantitate de cel puțin 12 µl de amestec reactiv de ADN amplificat, provenit de la fiecare probă, asociat cu 3 µl de tampon de încărcare (apendicele 6) se supun unei tensiuni de 5-8 V/cm pe geluri de agaroză la 2,0 % într-un tampon de EDTA (TAE) triacetat (apendicele 6). Se utilizează un marker de ADN adecvat, precum „100 bp ladder”.
- 6.3.2. Pentru a scoate în evidență benzile de ADN se folosește colorarea cu bromură de etidiu (la 0,5 mg/l) timp de 30-45 minute, luând precauțiile care se impun pentru manipularea agentului mutagen în cauză.
- 6.3.3. În cazul produselor PCR care au mărimea preconizată (apendicele 6), se vizualizează gelul colorat prin diafanoscopie sub unde UV scurte (de exemplu $\lambda = 302$ nm) și se notează rezultatele.

- 6.3.4. Pentru toate cazurile/rezultatele noi se verifică autenticitatea amplimerului, efectuând o analiză de restricție enzimatică pe o probă din ADN-ul amplificat rămas. În acest scop, se lasă la incubat la o temperatură optimă și pe o durată optimă, folosind o enzimă și un tampon corespunzătoare (a se vedea apendicele 6). Se decodează fragmentele digerate prin electroforeză pe gel de agaroză, în conformitate cu metoda indicată anterior și se vizualizează prin diafanie sub UV dispunerea caracteristică a fragmentelor după restricția enzimatică și colorarea cu bromură de etidiu. Se compară apoi cu martorii pozitivi dinainte și de după digestie.

Interpretarea rezultatului testului PCR:

Testul PCR este negativ, în cazul în care se observă în mod evident amplimerul PCR specific *C. m. ssp. sepedonicus* de mărimea preconizată pentru ansamblul probelor martori pozitivi, dar nu și pentru proba în cauză (în cazul unui PCR multiplex cu primeri de control intern specifici plantei, un al doilea produs PCR de mărimea preconizată trebuie amplificat cu proba în cauză).

Testul PCR este pozitiv, în cazul în care se observă în mod evident amplimerul PCR specific *C. m. ssp. sepedonicus* de mărimea și (în cazul în care este necesar) dispunerea postrestricție preconizate, cu condiția să nu fie amplificat cu una dintre probele martori negativi. De asemenea, se poate confirma cu încredere un rezultat pozitiv, repetând testul cu o a doua serie de primeri PCR (a se vedea secțiunea 9.3).

Nota bene:

Se poate suspecta o inhibiție a PCR, în cazul în care amplimerul preconizat se obține pe baza probei martor pozitiv care conține *C. m. ssp. sepedonicus* în soluție apoasă, atunci când martorii pozitivi care conțin *C. m. ssp. sepedonicus* în extractul de cartof dau un rezultat negativ. În protocoalele PCR multiplex cu controale PCR interne inhibiția reacției este probabilă atunci când nu se obține nici unul dintre cei doi amplimeri.

Se poate suspecta o contaminare, în cazul în care amplimerul preconizat este evidențiat în cel puțin unul dintre martorii negativi.

7. TESTUL BIOLOGIC

Nota bene:

Testele preliminare realizate în conformitate cu această metodă trebuie să permită detectarea reproductibilă a 10^3 - 10^4 celule/ml de *C. m. ssp. sepedonicus* care să formeze colonii, adăugate extractelor de probe care anterior au dat rezultate negative (pentru preparare, a se vedea apendicele 2).

Pentru a obține o sensibilitate maximă a detecției este preferabil să se utilizeze un extract de probă proaspăt preparat în condiții optime de creștere. Cu toate acestea, metoda poate fi aplicată cu succes pentru extracte conservate în soluție de glicerol la temperaturi între -68 °C și -86 °C.

Anumite varietăți de pătlăgea vânăta constituie un mediu excelent de îmbogățire selectivă pentru cultura de *C. m. ssp. sepedonicus*, chiar și în absența simptomelor și permit, de asemenea, realizarea unui excelent test de confirmare pe gazdă.

Pentru a reduce riscul de a obține rezultate negative false, condițiile de creștere trebuie să fie optime.

Pentru detaliile privind cultura, a se vedea apendicele 8.

- 7.1. Se repartizează pe pătlăgelele vinete, în conformitate cu una dintre metodele indicate în continuare (punctul 7.3 sau 7.4), tot restul de alicotă de test din extractul concentrat repus în suspensie, obținut în conformitate cu indicațiile din secțiunea 3.1.6 sau 3.2.5. Se folosesc doar plante ajunse în stadiul celei de-a doua sau a treia frunze, până la dezvoltarea completă a celei de-a treia frunze adevărate. Pentru a folosi integral extractul concentrat repus în suspensie și pentru a asigura eficacitatea inoculării, sunt necesare între 15 și 25 de pătlăgele vinete pe eșantion pentru efectuarea procedurilor descrise în continuare.
- 7.2. Înainte de inoculare, pătlăgelele vinete nu trebuie udate timp de una sau două zile pentru a reduce presiunea turgescenței.
- 7.3. Inoculare prin incizie
- 7.3.1. Se ține planta între două degete și se pune cu pipeta pe tulpină, între cotiledoane și prima frunză, o picătură (în jur de 5-10 μ l) de extract concentrat în suspensie.
- 7.3.2. Cu ajutorul unui scalpel steril se practică, plecând de la picătura de extract concentrat, o incizie diagonală cu o lungime de 1,0 cm și o adâncime aproximativ egală cu două treimi din grosimea tulpinii.
- 7.3.3. Se închide incizia cu vaselină sterilă, folosind o seringă.

7.4. Inoculare prin injecție

Inocularea se practică în tulpini de pătlăgele vinete, chiar deasupra cotiledoanelor, cu ajutorul unei seringi dotate cu un ac hipodermic (nu mai puțin de 23 G). Eșantionul se repartizează între pătlăgelele vinete.

7.5. Ca martori pozitivi, se inoculează cinci plante prin aceeași metodă (a se vedea punctul 7.3 sau 7.4) cu o suspensie apoasă care conține între 10^5 și 10^6 celule/ml dintr-o cultură cunoscută de *C. m. ssp. sepedonicus* și, în cazul în care este posibil, cu extract din tubercul infectat în mod natural (a se vedea secțiunea 4).

7.6. Ca martori negativi, se inoculează cinci plante prin aceeași metodă (a se vedea punctul 7.3 sau 7.4) cu o soluție tampon sterilă de extract concentrat.

7.7. Se lasă plantele la incubat până la patru săptămâni la temperaturi între 18 °C și 24 °C, în spații adaptate la condițiile de carantină. În timpul incubației se menține o lumină suficientă și un grad ridicat de umiditate (de la 70 % la 80 %), asigurând o udare adecvată pentru a evita orice obturare hidrică sau veștejire din cauza lipsei apei. Celulele de *C. m. ssp. sepedonicus* nu rezistă la temperaturi mai mari de 30 °C; temperatura ideală de cultură este de 21 °C. Pentru a evita riscurile de contaminare, martorii pozitivi și negativi se pun la incubat în seră sau fitotron pe etajere complet separate sau, în cazul în care spațiul este limitat, se prevede o compartimentare riguroasă. În cazul în care plante din eșantioane diferite trebuie să stea la incubat aproape unele de altele, plantele respective se vor separa cu ajutorul unor ecrane corespunzătoare. Se va acorda o mare atenție evitării contaminării încrucișate în timpul fertilizării, al udării, al inspecțiilor și în orice alt caz de manipulare. Este necesar să se evite prezența insectelor în sere sau fitotroane, deoarece sunt susceptibile de a răspândi bacteria de la un eșantion la altul.

7.8. După o săptămână, se examinează cu regularitate plantele pentru a identifica apariția simptomelor. Se numără plantele care prezintă simptome. *C. m. ssp. sepedonicus* provoacă la pătlăgeaua vânăta o veștejire a frunzelor, care se poate manifesta în primul rând printr-o flaciditate pe margini sau între nervuri. La început, țesutul veștejit poate lua o culoare verde închis sau un aspect pestriț, dar pălește înainte de a se necroza. Vestejirile dintre nervuri prezintă adesea aspectul gras al țesuturilor saturate cu apă. Țesutul necrozat prezintă adesea o margine de culoare galben viu. Plantele nu mor neapărat. Cu cât simptomele întârzie să apară, cu atât șansele de supraviețuire sunt mai mari. Plantele pot învinge infecția. Pătlăgelele vinete tinere sunt mult mai sensibile la populațiile slabe de *C. m. ssp. sepedonicus* decât plantele mai în vârstă, de unde necesitatea de a utiliza plante în stadiul celei de-a treia frunze sau chiar înaintea acestui stadiu.

Vestejirile mai pot fi provocate și de populații de alte bacterii sau de ciuperci prezente în extractul concentrat de țesut tubercular. Este vorba, printre altele, de *Ralstonia solanacearum*, de *Erwinia carotovora ssp. carotovora* și de *E. carotovora ssp. atroseptica*, de *Erwinia chrysanthemi*, de *Phoma exigua* var. *foveata*, precum și de vaste populații de bacterii saprofite. *Erwinia chrysanthemi*, în special, poate induce la nivelul frunzelor simptome și o veștejire foarte asemănătoare cu simptomele de *C. m. ssp. sepedonicus*, cu singura diferență că infecțiile cu *Erwinia chrysanthemi* provoacă o înnegrire a tulpinilor. Alte tipuri de veștejiri se disting de cele provocate de *C. m. ssp. sepedonicus* prin faptul că frunzele sau plantele întregi se ofilesc rapid. De asemenea, se poate recurge la o colorare Gram pentru a distinge *C. m. ssp. sepedonicus* de *Erwinia* spp.

7.9. Odată cu apariția simptomelor la pătlăgelele vinete trebuie să se efectueze noi operațiuni de izolare, pe baza segmentelor de țesut care provin de la frunzele veștejite sau pe baza tulpinii plantei (pentru macerarea țesuturilor, a se vedea punctul 3.1.3). Se dezinfectează suprafața frunzelor și a tulpinilor de pătlăgea vânăta, frecându-le cu etanol la 70 %. Se efectuează un test IF sau PCR pe seva de pătlăgea vânăta și se trece la izolarea pe mediu adecvat (selectiv) (a se vedea secțiunea 8). De asemenea, este posibil să se prepare o colorare Gram (a se vedea apendicele 9). Se identifică culturile pure de izolați presupuși de *C. m. ssp. sepedonicus* și li se confirmă patogenicitatea (a se vedea secțiunile 9 și 10).

7.10. În anumite circumstanțe și în special în cazul în care condițiile de cultură nu sunt optime, *C. m. ssp. sepedonicus* poate fi prezent în pătlăgelele vinete în stadiul de infecție latentă, chiar și după perioade de incubare care ajung până la patru săptămâni. În cazul în care după patru săptămâni nu se observă nici un simptom, se efectuează un test IF sau PCR pe o probă compozită de segmente de tulpini de 1 cm provenind de la fiecare plantă test, prelevate de deasupra punctului de inoculare. În cazul în care testul este pozitiv, se practică o nouă izolare pe un mediu adecvat (selectiv), în conformitate cu procedura expusă la secțiunea 8. Se identifică culturile pure de izolați presupuși de *C. m. ssp. sepedonicus* și li se confirmă patogenicitatea (a se vedea secțiunile 9 și 10).

Interpretarea rezultatelor testului biologic.

Rezultatele testului biologic sunt valabile atunci când plantele care constituie martorul pozitiv prezintă simptome caracteristice, atunci când este posibil să se efectueze o nouă izolare a bacteriilor pe plantele în cauză și atunci când nu se observă nici un simptom pe martorii negativi.

Testul biologic este negativ în cazul în care plantele test nu sunt infectate cu *C. m. ssp. sepedonicus*, sub rezerva ca *C. m. ssp. sepedonicus* să fie evidențiat pe martorii pozitivi.

Testul biologic este pozitiv în cazul în care plantele test sunt infectate cu *C. m. ssp. sepedonicus*.

8. IZOLAREA *C. M. SSP. SEPEDONICUS*

Nota bene:

Diagnosticul nu poate fi confirmat decât prin izolarea și evidențierea *C. m. ssp. sepedonicus* (a se vedea secțiunea 9), urmate de o validare printr-un test al puterii patogene (a se vedea secțiunea 10). Deși este vorba de un organism dificil de izolat, izolarea este posibilă pe baza țesutului care prezintă simptome de infecție.

Cu toate acestea, organismul poate fi sufocat de bacterii saprofite cu creștere rapidă, ceea ce îl face dificil de izolat în mod direct pe baza extractului concentrat de țesut de tubercul sau de tulpină (obținut la secțiunea 3.1.6 sau 3.2.5). Izolarea directă a *C. m. ssp. sepedonicus* rămâne posibilă pe mediu selectiv și pe baza unei diluții adecvate de extract concentrat, repus în suspensie, de conuri de cartofi prelevate de la stolonul sau tulpina de cartof.

Izolările trebuie practicate pe toți tuberculii sau pe toate segmentele de tulpini de cartofi și pe toate pătlăgelele vinete care nu prezintă nici un simptom, dar pentru care testul IF sau PCR efectuat pe proba compozită (a se vedea secțiunea 7.10) a dat un rezultat pozitiv. După caz, tulpinile de pătlăgele vinete trebuie să fie macerate, în conformitate cu metoda descrisă la secțiunea 3.1.3.

Ca martori pozitivi, se prepară diluții la a zecea parte dintr-o suspensie de 10^6 ufc/ml de *C. m. ssp. sepedonicus* (de exemplu, NCPPB 4053 sau PD 406). Pentru a evita orice posibilitate de contaminare, martorii pozitivi se prepară la distanță de probele care trebuie testate.

În cazul fiecărui lot de mediu selectiv nou preparat, trebuie să se verifice în ce măsură este adecvat pentru cultura agentului patogen înainte de a-l utiliza pentru testarea probelor de rutină.

Materialul de control se testează la fel ca și probele.

8.1. Desfășurare pe medii selectiv

8.1.1. Pe baza a 100 μ l de alicotă de probă de extract concentrat de cartof repus în suspensie sau de sevă de pătlăgea vântată, se efectuează diluții la a zecea parte într-un tampon de extract concentrat (a se vedea apendicele 3).

8.1.2. Tentativele de izolare pe bază de extract concentrat nediluat de cartof se soldează, în general, cu eșecuri datorită dificultăților pe care le prezintă cultura de *Cms* și a concurenței saprofitelor. Deoarece bacteria este în general prezentă în masă în țesuturile infectate, cel mai adesea este posibil să se evacueze saprofitele prin diluție, păstrând totodată agentul patogen. Prin urmare, se recomandă să se recurgă la tehnica de desfășurare pe lamă și să se desfășoare, cu ajutorul unui aplicator („crosă de hockey”), 100 μ l din fiecare probă, cu diluții de 1/100-1/10 000, pe un mediu MTNA sau NCP-88 (a se vedea apendicele 5).

Nota bene:

O altă strategie poate consta în desfășurarea alicotei inițiale de 100 μ l de extract concentrat de cartof pe o primă lamă de agar cu ajutorul unui aplicator, întinderea în striuri pe o a doua lamă a restului rămas pe aplicator și repetarea procedurii pe o a treia lamă. Aplicatorul permite astfel ca pe lame să se obțină un efect de diluție.

8.1.3. Se incubează lamele la adăpost de lumină și la temperaturi cuprinse între 21 °C și 23 °C.

8.1.4. Prima examinare a lamelor, cu numărarea, în raport cu lamele martori, a eventualelor colonii cu aspect asemănător cu *C. m. ssp. sepedonicus* trebuie să se efectueze după trei zile. Numărările ulterioare se vor efectua după cinci, șapte și, în final, zece zile.

8.2. Purificarea coloniilor suspecte

Nota bene:

Trebuie să se efectueze o repicare în mediu YGM a coloniilor cu aspect asemănător cu *C. m. ssp. sepedonicus* în scopul inoculării ulterioare a pătlăgelelor vinete și/sau al identificării. Operațiunea în cauză trebuie efectuată înainte ca lamele să atingă o abundență excesivă, respectiv, de preferință, după trei-cinci zile.

8.2.1. Se efectuează o însămânțare în striuri a coloniilor cu aspect asemănător cu *C. m. ssp. sepedonicus*, pe unul dintre următoarele medii (formulele figurează în apendicele 5):

agar nutritiv cu dextroză (numai pentru repicări);

agar cu drojdie, peptonă și glucoză;

agar cu extract de drojdie și săruri minerale.

Se lasă la incubat până la 10 zile la o temperatură cuprinsă între 21 °C și 24 °C.

C. m. ssp. sepedonicus se multiplică lent și produce, în general în zece zile, colonii de dimensiunea și de forma unui vârful de ac, convexe și de culoare crem (fotografiile ale coloniilor caracteristice de *C. m. ssp. sepedonicus* sunt prezentate la adresa <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

8.2.2. Se însămânțează din nou în striuri pentru a obține culturi pure.

Ratele de creștere sunt mai bune pentru repicări. Coloniile caracteristice sunt de culoare crem sau de culoarea fildeşului, uneori galbene, rotunjite, netede, umflate, convexe și având o consistență mucoid-fluidă. Coloniile au margini bine conturate, iar diametrul lor se întinde în general de la 1 la 3 mm.

O simplă colorare Gram (a se vedea apendicele 9) poate ajuta la selectarea coloniilor în vederea efectuării testelor suplimentare.

8.2.3. Se identifică culturile presupuse (a se vedea secțiunea 9) și se realizează un test al puterii patogene (a se vedea secțiunea 10).

9. IDENTIFICARE

Se identifică culturi pure de izolați presupuși de *C. m. ssp. sepedonicus* utilizând cel puțin două dintre testele prezentate în continuare, bazate pe principii biologice diferite.

După caz, pentru fiecare test efectuat se includ sușe de referință cunoscute.

9.1. Teste de identificare de nutriție și enzimatică

Se determină caracteristicile fenotipice menționate în continuare, care sunt în mod sistematic prezente sau absente la *C. m. ssp. sepedonicus*, în conformitate cu metodele lui Lelliott și Stead (1987), Klement *et al.* (1990), Schaad (2001) și anonim (1987).

Toate mediile trebuie să incubeze la 21 °C și să fie examinate după șase zile. În cazul în care nu se constată nici o multiplicare, se lasă la incubat până la 20 de zile.

Fiecare test trebuie să includă o sușă cunoscută de *C. m. ssp. sepedonicus* ca martor. Testele de nutriție și cele fiziologice trebuie să fie efectuate pe un inoculat provenit de la repicări pe agar nutritiv. Comparațiile morfologice trebuie să se efectueze pe baza culturilor pe agar nutritiv cu dextroză.

Teste	Rezultate preconizate
Oxidare/fermentare (O/F)	Inert sau slab oxidant
Oxidază	–
Creștere la 37 °C	–
Activitate ureazică	–
Hidroliza esculinei	+
Hidroliza amidonului	– sau slab
Toleranța unei soluții de NaCl la 7 %	–
Producție de indol	–
Activitatea catalazei	+
Producție de H ₂ S	–
Utilizare citrat	–
Lichefierea gelatinei	–
Producție de acid pe bază de glicerol	–
Producție de acid pe bază de lactoză	– sau slab
Producție de acid pe bază de ramnoză	–
Producție de acid pe bază de salicină	–
Colorare Gram (a se vedea apendicele 9)	+

- 9.2. **Test de imunofluorescență (IF)**
- Se prepară o suspensie de aproximativ 10^6 celule pe mililitru într-un tampon de imunofluorescență (a se vedea apendicele 3).
 - Se prepară o diluție la jumătate dintr-un antiser adecvat.
 - Se urmează procedura testului de imunofluorescență (a se vedea secțiunea 4).
 - Pentru ca un test IF să fie pozitiv, titrul obținut cu cultura trebuie să fie echivalent cu cel obținut cu martorul pozitiv.
- 9.3. **Test PCR**
- Se prepară o suspensie de aproximativ 10^6 celule pe mililitru în apă ultrapură.
 - Într-un bloc de încălzire sau într-o baie de apă fiartă, se încălzesc 100 μ l de suspensie în tuburi închise la 100 °C timp de 4 minute. În cazul în care este necesar, adăugarea de NaOH proaspăt preparat cu o concentrație finală de 0,05 M poate facilita liza celulelor. Probele pot fi depozitate la temperaturi între -16 °C și -24 °C, până în momentul utilizării.
 - Se aplică procedurile PCR adecvate pentru a amplifica amplimerii specifici ai *C. m. ssp. sepedonicus* (de exemplu: Pastrik, 2000; a se vedea apendicele 4; Li și de Boer, 1995; Mills *et al.*, 1997; Pastrik și Rainey, 1999; Schaad *et al.*, 1999).
 - Identificarea *C. m. ssp. sepedonicus* este pozitivă atunci când amplimerii PCR au aceeași dimensiune și prezintă aceleași polimorfisme de lungime a fragmentelor de restricție ca și pentru sușa martor pozitivă.
- 9.4. **Test FISH**
- Se prepară o suspensie de aproximativ 10^6 celule pe mililitru în apă ultrapură.
 - Se urmează procedura testului FISH (a se vedea secțiunea 5).
 - Testul FISH este pozitiv în cazul în care obținem aceleași reacții cu cultura și martorul pozitiv.
- 9.5. **Testul de profil al acizilor grași (FAP)**
- Cultura se dezvoltă timp de 72 de ore la 21 °C (+/-1 °C) pe agar de soia tripticaz (Oxoid).
 - Se aplică o procedură de test FAP adecvată (Janse, 1991; Stead, 1992).
 - Pentru ca un test FAP să fie pozitiv, profilul culturii presupuse trebuie să fie identic cu cel al martorului pozitiv. Prezența acizilor grași caracteristici 15:1 Anteiso A, 15:0 Iso, 15:0 Anteiso, 16:0 Iso, 16:0 și 17:0 Anteiso este puternic revelatoare de *C. m. ssp. sepedonicus*. Bacterii de alte tipuri, ca de exemplu *Curtobacterium*, *Arthrobacter* și *Micrococcus*, posedă, de asemenea, unii dintre acizii menționați, dar foarte rar 15:1 Anteiso A; în schimb, acidul menționat este prezent la toate *Clavibacter* spp., la niveluri cuprinse între 1 % și 5 %. În cazul *C. m. ssp. sepedonicus*, nivelul menționat gravitează de obicei în jurul valorii de 5 %.
- 9.6. **BOX-PCR**
- Se prepară o suspensie de aproximativ 10^6 celule pe mililitru în apă ultrapură.
 - Se efectuează testul în conformitate cu procedura (Smith *et al.*, 2001).
10. TEST DE CONFIRMARE
- Testul puterii patogene trebuie efectuat atât pentru a aduce confirmarea finală a unui diagnostic de *C. m. ssp. sepedonicus*, cât și pentru a evalua virulența culturilor identificate ca fiind *C. m. ssp. sepedonicus*.
- 10.1. Se prepară un inoculum de aproximativ 10^6 celule/ml pe baza unei culturi de trei zile a izolatului care trebuie testat și a unei sușe martor pozitive corespunzătoare de *C. m. ssp. sepedonicus*.

- 10.2. Se inoculează 5-10 tulpini de plante tinere de pătlăgea vânăță în stadiul celei de-a treia frunze (a se vedea secțiunea 7.3 sau 7.4).
- 10.3. Se pun la incubat la temperaturi cuprinse între 18 °C și 24 °C, la o umiditate relativ ridicată, asigurând o udare adecvată pentru a preveni obturarea hidrică sau stresul cauzat de secetă (a se vedea secțiunea 7.7.). În cazul culturilor pure, ar trebui să apară o vestejire tipică în două săptămâni; cu toate acestea, plantele care nu prezintă simptome (a se vedea secțiunea 7.8.) la sfârșitul perioadei menționate trebuie lăsate în continuare la incubat până la trei săptămâni, la temperaturi favorabile creșterii pătlăgelelor vinete, dar care să nu depășească 25 °C (a se vedea apendicele 8). În cazul în care cultura nu prezintă simptome la sfârșitul celor trei săptămâni, nu se poate confirma că este vorba despre o formă patogenă de *C. m. ssp. sepedonicus*.
- 10.4. Se asigură izolarea față de plantele simptomatice, prelevând o secțiune de tulpină la o înălțime de 2 cm deasupra punctului de inoculare. Se reduce și se pune în suspensie într-o cantitate mică de apă distilată sterilă sau de tampon fosfatat la 50 mM (a se vedea apendicele 3). Se izolează de suspensie, diluând prin însămânțare simplă sau în striuri pe MTNA și YPGA (a se vedea apendicele 5), se lasă la incubat timp de trei-cinci zile la o temperatură cuprinsă între 21 °C și 23 °C, apoi se observă formarea coloniilor caracteristice de *C. m. ssp. sepedonicus*.

Apendicele 1

Laboratoare care practică optimizarea și validarea protocoalelor

Laborator ⁽¹⁾	Localitate	Țară
Agentur fur Gesundheit und Ernährungssicherheit	Viena și Linz	Austria
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Belgia
Plantedirektoratet	Lyngby	Danemarca
Central Science Laboratory	York	Anglia
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburgh	Scoția
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	Franța
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Franța
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Germania
Pflanzenschutzamt Hannover	Hanover	Germania
State Laboratory	Dublin	Irlanda
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Țările de Jos
Norwegian Crop Research Institute, Plant Protection Centre	Aas	Norvegia
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lisabona	Portugalia
Nacionalni institut za biologijo	Ljubljana	Slovenia
Centro de Diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	Spania

⁽¹⁾ Pentru expertii de contact, consultați site-ul web la adresa <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

Apendicele 2

Prepararea martorilor pozitivi și negativi pentru aplicarea la conuri a testelor de depistare PCR/IF și FISH

Se pune în cultură timp de 72 de ore o sușă virulentă de *C. m. ssp. sepedonicus* [NCPPB 4053 sau PD 406] pe un mediu de bază MTNA și se pune în suspensie într-un tampon fosfatat la 10 mM, astfel încât să se obțină o densitate celulară de aproximativ $1-2 \times 10^8$ UFC pe mililitru. Aceasta corespunde, în general, unei suspensii ușor turbide care prezintă o densitate optică de 0,20-600 nm.

Se prelevează un con de stolon de la 200 de tuberculi dintr-o recoltă de varietate cu coajă albă, cunoscută ca fiind lipsită de *C. m. ssp. sepedonicus. solanacearum*.

Se tratează stolonii urmând metoda obișnuită și se repune extractul concentrat în suspensie de 10 mililitri.

Se varsă 900 μ l de extract concentrat repus în suspensie în zece microfirole sterile de 1,5 ml.

Se însămânțează prima microfiolă cu 100 μ l din suspensia de *C. m. ssp. sepedonicus*. Se omogenizează prin agitare.

Se stabilesc niveluri de contaminare la a zecea parte, urmând diluția în următoarele cinci microfirole.

Cele șase microfirole contaminate vor fi utilizate ca martori pozitivi. Cele patru microfirole necontaminate vor fi utilizate ca martori negativi. Microfirolele se etichetează în consecință.

Se prepară alicote de 100 μ l în microfirole sterile de 1,5 ml, astfel încât să se obțină nouă replici ale fiecărei probe martor. Se depozitează la temperaturi între -16 și -24 °C până în momentul utilizării.

Prezența și cuantificarea *C. m. ssp. sepedonicus* în probele martori trebuie confirmate în primul rând printr-un test de imunofluorescență.

Pentru testul PCR, se extrage ADN pe baza probelor martori pozitivi și negativi din fiecare serie de probe.

Pentru testele IF și FISH, se efectuează încercări pe probele martori pozitivi și negativi ai fiecărei serii de probe.

În cazul testelor IF, FISH și PCR, *C. m. ssp. sepedonicus* trebuie detectat la martorii pozitivi la cel puțin 10^6 și 10^4 celule/ml și trebuie să lipsească complet la martorii negativi.

Apendicele 3

Tampoane pentru procedurile de testare

GENERALITATE: tampoanele sterilizate care nu sunt deschise pot fi depozitate timp de maximum un an.

1. Tampoane pentru procedura de extragere**1.1. Tampon de extragere (tampon fosfatat la 50 mM, pH 7,0)**

Tamponul menționat este utilizat pentru extragerea, prin omogenizare sau agitare, a bacteriei prezente în țesuturile plantei.

Na ₂ HPO ₄ (anhidru)	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
Apă distilată	1,00 l

Se dizolvă ingredientele, se verifică pH-ul și se sterilizează cu autoclavă timp de 15 minute la 121 °C.

Următorii aditivi pot fi utili:

	Obiect	Cantitate (pe l)
Fulgi de Lubrol	Defloculant (*)	0,5 g
Antispumant cu DC silicon	Agent antispumant (*)	1,0 ml
Pirofosfat tetrasodic	Antioxidant	1,0 g
Polivinilpirolidonă-40 000 (PVP-40)	Legătură de inhibitori de PCR	50 g

(*) A se utiliza cu metoda de extragere prin omogenizare.

1.2. Tampon de extract concentrat (tampon fosfatat la 10 mM, pH 7,2)

Tamponul menționat este utilizat pentru repunerea în suspensie și diluția extractelor de stoloni de tuberculi de cartofi concentrați prin centrifugare.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,4 g
Apă distilată	1,00 l

Se dizolvă ingredientele, se verifică pH-ul și se sterilizează cu autoclavă timp de 15 minute la 121 °C.

2. Tampoane pentru testele de imunofluorescență**2.1. Tampon IF (tampon cu fosfat la 10 mM, pH 7,2)**

Tamponul menționat este utilizat pentru diluția anticorpilor.

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

Se dizolvă ingredientele, se verifică pH-ul și se sterilizează cu autoclavă timp de 15 minute la 121 °C.

2.2. *Tampon IF-Tween*

Tamponul menționat este utilizat pentru spălarea lamelor.

Se adaugă 0,1 % Tween 20 la tamponul IF.

2.3. *Glicerol tamponat cu fosfat, pH 7,6*

Tamponul menționat este utilizat ca lichid de suport pe ferestrele lamelor IF pentru a întări fluorescența.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	3,2 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,15 g
Glicerol	50 ml
Apă distilată	100 ml

Soluții suport antidecolorare sunt disponibile în comerț: de exemplu, Vectashield® (Vector Laboratories) sau Citifluor® (Leica).

Apendicele 4

Determinarea gradului de contaminare în momentul testelor IF și FISH

1. Se numără numărul mediu de celule fluorescente caracteristice pe câmp (c).
2. Se calculează celulele fluorescente caracteristice pe fereastră de lamă de microscop (C).

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

unde: S = suprafața (S) ferestrei unei lame cu multe godeuri și
s = suprafața câmpului obiectivului

$$s = \pi i^2 / 4G^2 K^2 \quad \text{unde: } i = \text{coeficientul câmpului (depinde de tipul de ocular și variază de la 8 la 24)}$$

K = coeficientul fiolei (1 sau 1,25)
G = mărirea obiectivului (de 100 de ori, de 40 de ori etc.)

3. Se calculează celulele fluorescente caracteristice pe mililitru de extract concentrat repus în suspensie (N)

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

unde: y = volumul de extract concentrat repus în suspensie pe fiecare fereastră și
F = factorul de diluție al extractului concentrat repus în suspensie

Apendicele 5

Medii de izolare și de cultură ale *C. m. ssp. sepedonicus*(a) *Medii de cultură de tip general*

Agar nutritiv

Agar nutritiv (Difco)	23,0 g
Apă distilată	1,0 l

Se dizolvă ingredientele și se sterilizează cu autoclavă timp de 15 minute la 121 °C.

Agar nutritiv cu dextroză

Agar nutritiv Difco Bacto care conține 1 % D-glucoză (monohidrat). Se sterilizează cu autoclavă la 115 °C timp de 20 de minute.

Agar cu drojdie, peptonă și glucoză (YPGA)

Extract de drojdie (Difco)	5,0 g
Bacto-peptonă (Difco)	5,0 g
D-glucoză (monohidrat)	10,0 g
Bacto-Agar (Difco)	15,0 g
Apă distilată	1,0 l

Se dizolvă ingredientele și se sterilizează cu autoclavă la 121 °C timp de 15 minute.

Mediu de cultură cu extract de drojdie și săruri minerale (YGM)

Extract de drojdie bacto (Difco)	2,0 g
D-glucoză (monohidrat)	2,5 g
K ₂ HPO ₄	0,25 g
KH ₂ PO ₄	0,25 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,015 g
NaCl	0,05 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,005 g
Bacto-Agar (Difco)	18 g
Apă distilată	1,0 l

Se dizolvă ingredientele și se sterilizează cu o jumătate de litru de autoclavă timp de 20 de minute la 115 °C.

(b) *Medii de creștere selective validate*

Mediu MTNA

Cu excepția unor mențiuni contrare, toate ingredientele provin de la BDH.

Extract de drojdie (Difco)	2,0 g
Manitol	2,5 g
K ₂ HPO ₄	0,25 g

KH_2PO_4	0,25 g
NaCl	0,05 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,015 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,005 g
Agar (oxoid nr. 1)	16,0 g
Apă distilată	1,0 l

Se dizolvă ingredientele și se ajustează pH-ul la 7,2. După o trecere prin autoclavă (15 minute la 121 °C) și o răcire la 50 °C, se adaugă antibioticele: trimetoprim 0,06 g, acid nalidixic 0,002 g, amfotericină B 0,01 g.

Soluțiile de antibiotice se depozitează după cum urmează: trimetoprimul (Sigma) și acidul nalidixic (Sigma) (ambele la 5 mg/ml) în metanol la 96 %; amfotericină B (Sigma) (1 mg/ml) în dimetilsulfoxid. Soluțiile depozitate sunt sterilizate prin filtrare.

Nota bene:

Mediul bazal se conservă timp de trei luni. După adăugarea antibioticelor, mediul se conservă o lună în atmosferă refrigerată.

Mediu NCP-88

Agar nutritiv (Difco)	23 g
Extract de drojdie (Difco)	2 g
D-manitol	5 g
K_2HPO_4	2 g
KH_2PO_4	0,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25 g
Apă distilată	1,0 l

Se dizolvă ingredientele și se ajustează pH-ul la 7,2. După o trecere prin autoclavă și răcire la 50 °C, se adaugă următoarele antibiotice: sulfat de polimixină B (Sigma) 0,003 g, acid nalidixic (Sigma) 0,008 g, cicloheximidă (Sigma) 0,2 g.

Antibioticele se dizolvă în soluții mamă: acidul nalidixic în NaOH la 0,01 M; cicloheximida în etanol la 50 %, sulfatul de polimixină B în apă distilată. Soluțiile depozitate sunt sterilizate prin filtrare.

Nota bene:

Mediul bazal se conservă timp de trei luni. După adăugarea antibioticelor, mediul se conservă o lună în atmosferă refrigerată.

Apendicele 6

Protocol și reactivi PCR validați

Nota bene:

Testele preliminare trebuie să permită detectarea reproductibilă a cel puțin 10^3 - 10^4 celule de *C. m. ssp. sepedonicus* pe mililitru de extract de probă.

De asemenea, testele preliminare nu trebuie să arate nici un fals rezultat pozitiv cu o gamă de sușe bacteriene selecționate.

1. Protocol PCR multiplex cu control PCR intern (Patrik, 2000)

1.1. Oligonucleotide primeri

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

Dimensiunea prevăzută a amplimerului matricei de ADN de *C. m. ssp. sepedonicus* = 502 bp (în prezența primerului PSA).

Dimensiunea prevăzută a amplimerului controlului PCR intern 18S rRNA = 377 bp (în prezența primerului NS).

1.2. Amestec reactiv destinat PCR

Reactiv	Cantitate pe reacție	Concentrație finală
Apă ultrapură sterilă	15,725 μ l	
10x tampon PCR ⁽¹⁾ (15 mM MgCl ₂)	2,5 μ l	1 \times (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (fracție V) (10 %)	0,25 μ l	0,1 %
Amestec d-nTP (20 mM)	0,125 μ l	0,1 mM
Primer PSA-1 (10 μ M)	0,5 μ l	0,2 μ M
Primer PSA-R (10 μ M)	0,5 μ l	0,2 μ M
Primer NS-7-F (10 μ M) ⁽²⁾	0,1 μ l	0,04 μ M
Primer NS-8-R (10 μ M) ⁽²⁾	0,1 μ l	0,04 μ M
Polimerază Taq (5U/ μ l) ⁽¹⁾	0,2 μ l	1,0 U
Volumul probei	5,0 μ l	
Volum total:	25,0 μ l	

⁽¹⁾ Metodele au fost validate utilizând polimeraza Taq a lui Perkin Elmer (AmpliTaq sau Gold) și Gibco BRL.

⁽²⁾ Concentrațiile primerilor NS-7-F și NS-8-R au fost optimizate pentru extragerea nucleelor de stloni de cartofi, utilizând metoda omogenizării și a purificării ADN-ului după Patrik (2000) [a se vedea secțiunile 6.1. (a) și 6.2]. Va fi necesară o nouă optimizare a concentrațiilor de reactivi, în cazul în care se utilizează extragerea prin agitație sau alte metode de izolare a ADN-ului.

1.3. Condiții ale reacției PCR

Se execută următorul program:

1 ciclu de:	(i)	3 minute la 95 °C: denaturarea matricei ADN;
10 cicluri de:	(ii)	1 minut la 95 °C: denaturarea matricei ADN;
	(iii)	1 minut la 64 °C: hibridizare cu primerii;
	(iv)	1 minut la 72 °C: extinderea ADN-ului complementar;

- 25 de cicluri de: (v) 30 secunde la 95 °C: denaturarea matricei ADN;
(vi) 30 secunde la 62 °C: hibridizare cu primerii;
(vii) 1 minut la 72 °C: extinderea ADN-ului complementar;
- 1 ciclu de: (viii) 5 minute la 72 °C: extindere finală;
(ix) se menține la 4 °C.

Nota bene:

Acest program a fost optimizat pentru o utilizare cu un termociclu MJ Research PTC 200. Poate fi necesară modificarea etapelor ciclurilor (ii), (iii), (iv), (v), (vi) și (vii) pentru utilizarea cu alte modele.

1.4. *Analiza restricției enzimatică a amplimerului*

Produsele PCR amplificate ale ADN-ului *C. m. ssp. sepedonicus* produc un polimorfism distinct al lungimii fragmentelor de restricție cu enzima *Bgl* II, după incubare la 37 °C timp de 30 de minute. Fragmentele de restricție obținute pe baza fragmentului specific de *C. m. ssp. sepedonicus* au o lungime de 282 bp și 220 bp.

2. **Prepararea tamponului de încărcare**

2.1. *Bromofenol albastru (soluție concentrată la 10 %)*

Bromofenol albastru	5 g
Apă distilată (bidest)	50 ml

2.2. *Tampon de încărcare*

Glicerol (86 %)	3,5 ml
Bromofenol albastru (5,1)	300 μl
Apă distilată (bidest)	6,2 ml

3. **10x tampon de EDTA (TAE) triacetat, pH 8,0**

Tampon tri	48,4 g
Acid acetic glacial	11,42 ml
EDTA (sare disodică)	3,72 g
Apă distilată	1,00 l

Înainte de utilizare se diluează până la 1x.

Disponibil și în comerț (de exemplu, Invitrogen sau echivalent).

Apendicele 7

Reactivi validați pentru testul FISH

1. Oligosonde

Sonda CMS-CY3-01 specifică pentru Cms	5' -ttg cgg ggc gca cat ctc tgc acg-3'
Sonda eubacteriană EUB-338-FITC nespecifică	5'-gct gcc tcc cgt agg agt-3'

2. Soluție de fixare

[ATENȚIE! FIXATIVUL CONȚINE PARAFORMALDEHIDĂ, CARE ESTE TOXICĂ. SE POARTĂ MĂNUȘI ȘI NU SE INHALEAZĂ. SE RECOMANDĂ SĂ SE LUCREZE SUB O NIȘĂ DE ELIMINARE A SUBSTANȚELOR CHIMICE].

- (i) Se încălzesc 9 ml de apă pură moleculară (de exemplu, apă ultrapură) la aproximativ 60 °C și se adaugă 0,4 g de paraformaldehidă. Paraformaldehida se dizolvă după ce s-au adăugat 5 picături de 1N NaOH și se amestecă cu un agitator magnetic.
- (ii) Se ajustează pH-ul la 7,0 adăugându-se 1 ml de tampon fosfatat la 0,1 M (PB; pH 7,0) și 5 picături de 1N HCl. Se verifică pH-ul cu bandele indicatoare și se ajustează, în cazul în care este necesar, cu HCl sau NaOH.

[ATENȚIE! NU SE UTILIZEAZĂ PH-METRU ÎN SOLUȚII CARE CONȚIN PARAFORMALDEHIDĂ].

- (iii) Soluția se filtrează printr-un filtru cu membrană de 0,22 μm și se protejează de praf la 4 °C până la utilizare.

- (iv) *Nota bene:*

Soluție de fixare de înlocuire: etanol la 96 %.

3. Hibmix 3x

NaCl	2,7 M
Tri-HCl	60 mM (pH 7,4)
EDTA (filtru sterilizat și trecut prin autoclavă)	15 mM

Se diluează până la 1x, după caz.

4. Soluție de hibridizare

Hibmix 1x

Dodecilsulfat de sodiu (SDS)	0,01 %
Sondă EUB 338	5 ng/μl
Sondă CMSCY301	5 ng/μl

Se prepară cantități de soluție de hibridizare, respectând calculele din tabel. Pentru fiecare lamă (care conține 2 probe diferite în duplicat), sunt necesari 90 μl de soluție de hibridizare.

Tabel: Cantități sugerate pentru prepararea amestecului de hibridizare

	2	8
Apă ultrapură sterilă	50,1	200,4
Hibmix 3x	30,0	120,0
1 % Dodecilsulfat de sodiu	0,9	3,6
Sondă EUB 338 (100 ng/μl)	4,5	18,0
Sondă CMSCY301 (100 ng/μl)	4,5	18,0
Volum total (μl)	90,0	360,0

Nota bene: Toate soluțiile care conțin oligosonde sensibile la lumină se depozitează la întuneric și la o temperatură de -20 °C. În timpul utilizării se protejează de lumina directă a soarelui sau de lumina electrică directă.

5. Tampon fosfatat 0,1 M, pH 7,0

Na ₂ HPO ₄	8,52 g
KH ₂ PO ₄	5,44 g
Apă distilată	1,00 l

Se dizolvă ingredientele, se verifică pH-ul și se sterilizează cu autoclavă timp de 15 minute la 121 °C.

*Apendicele 8***Culturi de pătlăgele vinete**

Se seamănă semințe de pătlăgele vinete (*Solanum melongena*) într-un pământ de semănat pasteurizat. Atunci când cotiledoanele sunt complet dezvoltate (10-14 zile), plantulele se repică într-un pământ de replantat pasteurizat.

Pătlăgelele vinete trebuie cultivate în seră în următoarele condiții:

Durata zilei		14 ore sau durata naturală a zilei, în cazul în care este mai mare
Temperatura:	ziua	21-24 °C
	noaptea	15 °C.

Varietăți sensibile de pătlăgele vinete: „Black Beauty”;
„Long Tom”;
„Rima”;
„Balsas”.

Furnizor: a se vedea site-ul web la adresa <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

Apendicele 9

Procedura pentru reacția Gram (modificarea lui Hucker) (Doetsch, 1981) ⁽¹⁾*Soluție de violet cristalizat*

Se dizolvă 2 g de violet cristalizat în 20 ml de etanol la 95 %.

Se dizolvă 0,8 g de oxalat de amoniu în 80 ml de apă distilată.

Se amestecă cele două soluții.

Soluția iodo-iodurată a lui Lugol

Iod	1 g
Iodură de potasiu	2 g
Apă distilată	300 ml

Substanțele solide se zdrobesc împreună cu ajutorul unui pistil și al unui mojar. Se adaugă apa și se amestecă într-un recipient închis pentru a se dizolva.

Soluție colorantă de safranină

Soluție mamă:

Safranină O	2,5 g
Etanol la 95 %	100 ml

Se amestecă și se depozitează.

Se diluează în raport 1:10 pentru a obține o soluție de lucru.

Procedura de colorare

1. Se prepară frotiurile, se usucă la aer și se fixează la căldură.
2. Se scufundă lama în soluția de cristal violet timp de un minut.
3. Se spală rapid cu apă curentă.
4. Se scufundă în soluția iodo-iodurată a lui Lugol timp de un minut.
5. Se spală cu apă de robinet și se usucă cu hârtia sugativă.
6. Se decolorează adăugând picătură cu picătură etanol la 95 %, până când nu își mai modifică culoarea sau scufundând în etanol timp de 30 de secunde și agitând ușor.
7. Se spală cu apă de robinet și se usucă cu hârtia sugativă.
8. Se scufundă în soluția de safranină timp de 10 secunde.
9. Se spală cu apă de robinet și se usucă cu hârtia sugativă.

Bacteriile Gram pozitive au o culoare violet-albastră; bacteriile Gram negative au o culoare roz-roșie.

⁽¹⁾ Se pot utiliza, de asemenea, ansambluri și soluții de colorare disponibile în comerț.

REFERINȚE

1. Anonymous, 1987. Scheme of the detection and diagnosis of the ring rot bacterium *Corynebacterium sepedonicum* in batches of potato tubers. Commission of the European Communities, Luxembourg. Publ EUR 11288 EN, 21 pp.
2. Bradbury, J. F., 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. Rev. Pl. Path., 49, 213-218.
3. Dinesen, I. G., 1984. The extraction and diagnosis of *Corynebacterium sepedonicum* from diseased potato tubers. EPPO Bull. 14 (2), 147-152.
4. Doetsch, R. N., 1981. Determinative methods of light microscopy. In: Manual of methods for general bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, 21-23.
5. Hugh, R. and Leifson, F., 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. J. Bact., 66, 24-26.
6. Janse, J. D., 1991. Infra- and intra-specific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fattyacid analysis. Systematic and Applied Microbiology 14; 335-345.
7. Janse, J. D. and J. Van Vaerenbergh. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (*Corynebacterium sepedonicum*) in potato. EPPO Bull., No 17, 1987, pp. 1-10.
8. Jansing, H. and K. Rudolph, 1998. Physiological capabilities of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* and development of a semi-selective medium. Journal of Plant Diseases and Protection, 105, 590-601.
9. Kovacs, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature, Lond., 178, 703.
10. Klement Z.; Rudolph, K and D. C. Sands, 1990. Methods in Phytobacteriology. Akademiai Kiado, Budapest, 568 pp.
11. Lelliott, R. A., 1966. The plant pathogenic coryneform bacteria. J. appl. Bact., 29, 114-118.
12. Lelliott, R. A., E. Billing and A. C. Hayward, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads J. appl. Bact., 29, 470-489.
13. Lelliott, R. A. and P. W., Sellar, 1976. The detection of latent ring rot (*Corynebacterium sepedonicum* (Spiek. et Kotth.) Skapt. et Burkh.) in potato stocks. EPPO Bull., 6 (2), 101-106.
14. Li, X. and S.H. de Boer, 1995. Selection of Polymerase Chain Reaction primers from RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Phytopathology, 85, 837-842.
15. Mills, D., Russell, B., W. and J., W. Hanus, 1997. Specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* by amplification of three unique DNA sequences isolated by subtraction hybridization. Phytopathology, 87, 8, 853-861.
16. Pastrok, K.-H. and R.A. Rainey. 1999. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. J. Phytopathology 147; 687-693.
17. Pastrok, K.-H., 2000. Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. European Journal of Plant Pathology, 106, 155-165.
18. Ramamurthi, C. S., 1959. Comparative studies on some Gram-positive phytopathogenic bacteria and their relationship to the Corynebacteria. Mem. Cornell agric. Exp. Sta., 366, 52 pp.
19. Schaad, W., Berthier-Schaad, Y., Sechler, A. and Knorr, D. (1999) Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system. Plant Disease 83; 1095.1100.
20. Schaad, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Schaad [Hrsg.]. 3. ed.; St. Paul, Minnesota; 373 pp.
21. Skerman, V. B. D., 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria. 2nd ed., William and Wilkins Company, Baltimore.
22. Smith, N. C.; Hennessy, J; Stead, D.E., 2001. Repetitive sequence-derived PCR profiling using the BOX-A1 *Ralstonia solanacearum* primer for rapid identification of plant pathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. European Journal of Plant Pathology, 107 (7), 739-748.
23. Sneath, P. H. A. and V. G. Collins, 1974. A study in test reproductibility between laboratories: report of Pseudomonas working party. Antonie van Leeuwenhoek, 40, 481-527.
24. Stead, D.E. 1992. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty-acid profiles. International Journal of Systematic Bacteriology 42; 281-295.
25. Wullings, B. A.; van Beuningen, A. R.; Janse, J. D. and A. D. L. Akkermans, 1998. Detection of *Ralstonia solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent *in situ* hybridization with 23s rRNA-targeted probes. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4546-4554.

ANEXA II

1. În toate cazurile de apariție suspectată pentru care s-a constatat, cu ocazia testului sau testelor de depistare efectuate în conformitate cu metodele descrise de anexa I, o reacție pozitivă care trebuie infirmată sau confirmată prin aplicarea procedurilor menționate, trebuie să se păstreze și să se conserve în condiții adecvate:
 - toți tuberculii care fac parte din eșantion și, în măsura posibilului, toate plantele care fac parte din eșantion;
 - orice extract rezidual și material suplimentar preparat pentru testul sau testele de depistare, precum lamele preparate pentru testele de imunofluorescență
 - și
 - orice documentație relevantă,până la încheierea respectivelor proceduri.

După caz, conservarea tuberculilor va permite testarea varietăților.
 2. În cazul confirmării prezenței organismului, trebuie să se păstreze și să se conserve în condiții adecvate:
 - materialul menționat la punctul 1
 - și
 - o probă de pătlăgea vânăta infectată prin inoculare cu extract de tubercul sau de plantă
 - și
 - cultura izolată a organismuluitimp de cel puțin o lună după procedura de notificare prevăzută la articolul 5 alineatul (2).
-

ANEXA III

1. Pentru a determina extinderea contaminării probabile menționate la articolul 5 alineatul (1) litera (b), trebuie să se ia în considerare următoarele elemente:
 - tuberculii sau plantele cultivate într-un loc de producție declarat contaminat în temeiul articolului 5 alineatul (1) litera (a);
 - locul (locurile) de producție care au, în sistemul de producție, o legătură cu tuberculii sau plantele care au fost declarate contaminate în temeiul articolului 5 alineatul (1) litera (a), inclusiv cele care folosesc același echipament și aceleași instalații de producție în mod direct sau prin intermediul unui antreprenor comun;
 - tuberculii sau plantele produse în locul sau locurile de producție menționat(e) la liniuța anterioară sau prezente în locul (locurile) respectiv(e) în perioada în care tuberculii sau plantele declarate contaminate în temeiul articolului 5 alineatul (1) litera (a) erau prezente în locurile de producție menționate la prima liniuță;
 - instalațiile unde sunt manipulați cartofii care provin din locurile de producție menționate anterior;
 - orice material, vehicul, recipient, antrepozit sau parte a acestora, precum și orice alt obiect, inclusiv ambalajul, care este posibil să fi fost în contact cu tuberculii sau plantele declarate contaminate în conformitate cu articolul 5 alineatul (1) litera (a) punctul (ii);
 - orice tubercul sau plantă depozitată în sau în contact cu unul dintre elementele sau obiectele menționate la liniuța precedentă, înainte de curățarea și dezinfectarea acestora;
 - în urma testelor menționate la articolul 6, tuberculii sau plantele care au o legătură clonală sau parentală cu tuberculii sau plantele declarate contaminate în conformitate cu articolul 5 alineatul (1) litera (a) punctul (ii) și pentru care, deși rezultatele testelor referitoare la prezența organismului au fost negative, se pare că este probabilă contaminarea prin intermediul unei legături clonale. Se poate efectua un test asupra varietăților pentru a identifica identitatea tuberculilor sau a plantelor contaminate care au o astfel de legătură clonală și
 - locul (locurile) de producție a tuberculilor sau a plantelor menționate la liniuța anterioară.
2. Pentru a determina posibila răspândire menționată la articolul 5 alineatul (1) litera (c), trebuie să se ia în considerare următoarele elemente:
 - apropierea de alte locuri de producție unde se cultivă cartofi sau alte plante gazdă;
 - producția și utilizarea comună a stocurilor de cartofi de sămânță.
3. Notificarea menționată la articolul 5 alineatul (2) primul paragraf cuprinde:
 - de îndată după confirmarea prezenței organismului prin teste de laborator efectuate în conformitate cu metodele prevăzute de anexa I, minimum:
 - denumirea varietății lotului de cartofi;
 - tipul (conservare, semințe etc.) și, după caz, categoria de semințe de cartofi;
 - atunci când există riscul de contaminare a cartofilor proveniți dintr-unul sau mai multe state membre sau care au ca destinație unul sau mai multe state membre, statul membru în care a fost confirmat focarul comunică de îndată statului membru sau statelor membre în cauză informațiile care le permit să acționeze în conformitate cu articolul 5 alineatul (3), respectiv:
 - denumirea varietății lotului de cartofi;
 - numele și adresa expeditorului și destinatarului;
 - data livrării lotului de cartofi;

- volumul lotului de cartofi livrat;
- după caz, o copie a pașaportului fitosanitar sau cel puțin numărul pașaportului fitosanitar, precum și, după caz, numărul de înregistrare al producătorului sau al comerciantului și o copie a bonului de livrare.

Comisiei i se notifică de îndată comunicarea acestor informații.

- După încheierea tuturor investigațiilor, pentru fiecare caz:
 - data la care s-a confirmat contaminarea;
 - o scurtă descriere a investigațiilor desfășurate în scopul de a identifica sursa și posibila răspândire a contaminării, precizând nivelul de eșantionare aplicat;
 - informații privind sursa sau sursele identificate sau presupuse ale contaminării;
 - precizări ale întinderii contaminării declarate, inclusiv numărul de locuri de producție și numărul de loturi, cu indicarea varietății și, în cazul în care este vorba despre cartofi de sămânță, a categoriei;
 - precizări asupra delimitării zonei, inclusiv numărul de locuri de producție nedeclarete ca fiind contaminate, dar incluse în zonă;
 - toate celelalte informații pe care Comisia le-ar putea solicita, referitoare la focarul sau focarele declarate.
-

ANEXA IV

1. Măsurile sub control oficial, menționate la articolul 7 alineatul (1), sunt următoarele:

- utilizarea ca aliment destinat animalelor după un tratament termic de natură să elimine orice risc de supraviețuire a agentului patogen

sau

- descărcarea într-un centru de eliminare a deșeurilor autorizat în mod oficial, care nu prezintă nici un risc identificabil de propagare a agentului patogen în mediu, de exemplu, prin infiltrare în terenuri agricole

sau

- incinerarea

sau

- transformarea industrială prin livrare directă și imediată la o întreprindere de transformare care dispune de instalații de eliminare a deșeurilor autorizate oficial, despre care s-a stabilit că nu prezintă nici un risc identificabil de propagare a organismului, precum și de un sistem care să permită curățarea și dezinfectarea cel puțin a vehiculelor care părăsesc întreprinderea

sau

- alte măsuri, în măsura în care s-a stabilit că acestea nu prezintă nici un risc identificabil de propagare a organismului, măsurile menționate și justificarea acestora trebuind, de altfel, notificate Comisiei și celorlalte state membre.

Toate deșeurile care rămân la încheierea operațiilor menționate anterior sau care rezultă din operațiile respective sunt eliminate, urmând metodele aprobate oficial, în conformitate cu anexa V la prezenta directivă.

2. Utilizarea sau eliminarea adecvată a tuberculilor sau a plantelor declarate ca fiind probabil contaminate în temeiul articolului 5 alineatul (1) litera (b) și menționate la articolul 7 alineatul (2), sub controlul organismelor oficiale competente ale statelor membre în cauză și prin intermediul unei comunicări adecvate între organismele oficiale competente pentru a garanta permanent control respectiv, precum și acordul organismelor oficiale competente ale statului membru în care cartofii trebuie ambalați sau transformați, cu privire la instalațiile de eliminare a deșeurilor menționate la prima și a doua liniuță, implică:

- utilizarea acestora ca și cartofi de conservare pentru consum, în ambalaje prevăzute pentru livrare și utilizare directe care nu necesită reambalare, într-un loc care dispune de instalații adecvate de eliminare a deșeurilor. Cartofii pentru plantare nu pot fi manipulați în același loc decât separat sau după curățare și dezinfectare

sau

- utilizarea acestora ca și cartofi de conservare destinați transformării industriale după livrare directă și imediată la o întreprindere de transformare care dispune de instalații adecvate de eliminare a deșeurilor, precum și de un sistem care permite curățarea și dezinfectarea cel puțin a vehiculelor care părăsesc întreprinderea

sau

- un alt mod de utilizare sau eliminare, în măsura în care s-a stabilit că nu există nici un risc identificabil de propagare a organismului și sub rezerva acordului respectivelor organisme oficiale competente.

3. Metodele adecvate de curățare și de dezinfectare a obiectelor menționate la articolul 7 alineatul (3) sunt cele despre care s-a stabilit că nu prezentau nici un risc identificabil de propagare a organismului; acestea sunt aplicate sub supravegherea organismelor oficiale responsabile ale statelor membre.

4. Măsurile care trebuie puse în aplicare de către statele membre în zona delimitată, stabilită în temeiul articolului 5 alineatul (1) litera (c) și menționate la articolul 7 alineatul (4) cuprind următoarele măsuri:

4.1. la locurile de producție declarate contaminate în temeiul articolului 5 alineatul (1) litera (a):

(a) într-un teren declarat contaminat în temeiul articolului 5 alineatul (1) litera (a):

(i) — cel puțin pe durata celor trei ani de recoltă de după anul de recoltă al contaminării declarate:

— se iau măsuri în vederea eliminării culturilor spontane de cartofi și de alte plante gazde ale organismului

și

— nu se plantează și nu se seamănă nici un tubercul, plantă sau sămânță de cartof, nici o altă plantă gazdă a organismului și nici o cultură pentru care există un risc identificat de propagare a organismului;

— în timpul primului an de recoltă a cartofilor, ulterior perioadei indicate la liniuța anterioară și cu condiția ca terenul să fi fost declarat lipsit de culturi spontane de cartofi și de alte plante gazde ale organismului timp de cel puțin doi ani de recoltă consecutivi înainte de plantare, nu se va autoriza decât producția de cartofi de conservare, iar tuberculii recoltați vor fi testați în conformitate cu procedura detaliată de anexa I;

— în timpul sezonului de recoltă a cartofilor, ulterior celui menționat la liniuța anterioară și după un ciclu adecvat de rotație, care este de doi ani în cazul culturilor de plante de cartofi, se autorizează plantarea cartofilor pentru producția de semințe sau de cartofi de conservare și se efectuează cercetări oficiale, în conformitate cu articolul 2 alineatul (1) sau

(ii) — în timpul celor patru ani de recoltă care urmează după cel al contaminării declarate:

— se adoptă măsuri în vederea eliminării culturilor spontane de cartofi și de alte plante gazde ale organismului

și

— terenul este fie lăsat în paragină, fie este transformat în pășune permanentă, caz în care este frecvent cosit la bază sau este transformat în pășune intensivă;

— în timpul primului an de recoltă a cartofilor, ulterior perioadei indicate la liniuța anterioară și cu condiția ca terenul să fi fost declarat lipsit de culturi spontane de cartofi și de alte plante gazde ale organismului timp de cel puțin doi ani de recoltă consecutivi înainte de plantare, se va autoriza producția de semințe sau de cartofi de conservare, iar tuberculii recoltați vor fi testați în conformitate cu procedura detaliată de anexa I;

(b) pe toate celelalte terenuri din locul de producție contaminat și cu condiția ca organismele oficiale competente să dobândească certitudinea că riscul reprezentat de culturile spontane de cartofi și de alte plante gazde ale organismului prezente în mod natural a fost eliminat:

— în cursul anului de recoltă ulterior celui al contaminării declarate, fie nu se plantează și nu se seamănă nici un tubercul, plantă sau sămânță veritabilă de cartof și nici o altă plantă gazdă a organismului prezente în mod natural;

— fie se pot planta plante de cartofi certificate în mod oficial, exclusiv în vederea producției de cartofi de conservare;

— în cursul celui de-al doilea an de recoltă ulterior anului de recoltă al contaminării declarate sunt plantate doar semințe certificate sau plante de cartofi care au fost supuse unei depistări oficiale a veștejirii bacteriene și cultivate sub control oficial în alte locuri de producție decât cele menționate la punctul 4.1, în vederea producției de semințe sau de cartofi de conservare;

— cel puțin în timpul celui de-al treilea an de recoltă ulterior anului de recoltă al contaminării declarate, se plantează doar plante de cartofi certificate sau plante de cartofi cultivate sub control oficial, pe baza plantelor de cartofi certificate, în vederea producției de cartofi de sămânță sau de conservare;

- în timpul fiecăruia dintre anii de recoltă menționați la punctele precedente, se iau măsuri pentru eliminarea culturilor spontane de cartofi, precum și, după caz, de plante gazde ale organismului și în fiecare teren cu cartofi se efectuează teste oficiale asupra cartofilor recoltați, în conformitate cu procedura detaliată de anexa I;
 - (c) de îndată după ce s-a declarat contaminarea în conformitate cu articolul 5 alineatul (1) litera (a) și după primul an de recoltă următor, tot materialul și toate instalațiile de depozitare prezente la locul de producție și implicate în producția de cartofi sunt curățate și dezinfectate, după caz, folosind metode adecvate, în conformitate cu punctul 3;
 - (d) într-o unitate de producție în cultură protejată care permite înlocuirea completă a mediului de cultură,
 - nu se plantează și nu se seamănă nici un tubercul, plantă sau sămânță, decât în cazul în care unitatea de producție a fost supusă unor măsuri sub control oficial având ca scop eliminarea organismului și a tuturor plantelor gazdă, inclusiv, cel puțin, înlocuirea completă a mediului de cultură, precum și curățarea și dezinfectarea unității de producție și a tuturor echipamentelor și în cazul în care organismele oficiale responsabile au autorizat ulterior unitatea pentru producția de cartofi
- și
- producția de cartofi este rezultată din plante de cartofi certificate, din minituberculi sau din microplante provenite din surse testate;
- 4.2. în interiorul zonei delimitate, fără a aduce atingere măsurilor enumerate la punctul 4.1, statele membre:
- (a) solicită, de îndată după declararea contaminării, ca toate mașinile și instalațiile de depozitare situate în locul de producție să fie curățate și, în cazul în care este necesar, dezinfectate, în conformitate cu metodele adecvate menționate la punctul 3;
 - (b) de îndată după declararea contaminării și timp de cel puțin trei perioade de vegetație:
 - solicită organismelor oficiale responsabile să supravegheze instalațiile de cultură, depozitarea și întreținerea tuberculilor de cartofi, precum și sediile întreprinderilor care exploatează prin contract materialul utilizat în cultura cartofului;
 - solicită ca în zona respectivă să fie plantate doar semințe certificate sau semințe cultivate sub control oficial, pentru toate culturile de cartofi, iar cartofii de sămânță recoltați din locurile de producție declarate ca fiind probabil contaminate în temeiul articolului 5 alineatul (1) litera (b) să fie testați;
 - solicită, în cazul tuturor instalațiilor din zonă, ca stocurile de plante de cartofi recoltați și stocurile de plante de cartofi de conservare să fie depozitate separat sau să se pună în aplicare un sistem de curățare și de dezinfectare între păstrarea plantelor de cartofi și cea a cartofilor de conservare;
 - efectuează cercetări oficiale în conformitate cu articolul 2 alineatul (1);
 - (c) stabilesc, după caz, un program de înlocuire a tuturor stocurilor de plante de cartofi în decursul unei perioade corespunzătoare.
-

ANEXA V

Pentru a preveni orice risc identificabil de propagare a organismului, instalațiile de eliminare a deșeurilor, aprobate în mod oficial și menționate de anexa IV punctul 1, respectă dispozițiile următoare:

(i) Deșeurile de cartofi (inclusiv cartofii respinși și cojile) și orice alt deșeu solid care are legătură cu cartofii (inclusiv pământul, pietrele și alte resturi) sunt eliminate:

— într-un centru de eliminare a deșeurilor aprobat oficial, care nu prezintă nici un risc identificabil de propagare a organismului patogen în mediul înconjurător, de exemplu, prin infiltrare în terenuri agricole, deșeurile fiind transportate direct la locul respectiv în condiții de izolare care să prevină orice risc de pierdere

sau

— prin incinerare

sau

— prin alte măsuri, în măsura în care s-a stabilit că măsurile respective nu prezintă nici un risc identificabil de propagare a organismului. Măsurile în cauză trebuie notificate Comisiei și statelor membre.

(ii) Efluenții lichizi: înainte de eliminare, efluenții lichizi care conțin solide în suspensie sunt supuși unui procedeu de filtrare sau de decantare pentru a extrage solidele respective. Solidele sunt eliminate în conformitate cu dispozițiile punctului (i).

Apoi, efluenții lichizi sunt:

— fie încălziți complet la o temperatură de 60 °C timp de cel puțin 30 de minute înainte de a fi eliminați;

— fie eliminați într-un alt mod, sub rezerva acordului oficial și sub control oficial, astfel încât să nu existe nici un risc identificabil ca deșeurile să intre în contact cu terenuri agricole. Modalitățile sunt notificate celorlalte state membre, precum și Comisiei.

Diferitele proceduri descrise de prezenta anexă se aplică în egală măsură și deșeurilor legate de manipularea, eliminarea și tratarea loturilor contaminate.
