

31993L0085

L 259/1

JURNALUL OFICIAL AL COMUNITĂȚILOR EUROPENE

18.10.1993

DIRECTIVA 93/85/CEE A CONSILIULUI
din 4 octombrie 1993
privind combaterea veștejirii bacteriene a cartofului

CONSILIUL COMUNITĂȚILOR EUROPENE,

având în vedere Tratatul de instituire a Comunității Economice Europene, în special articolul 43,

având în vedere propunerea Comisiei ⁽¹⁾,

având în vedere avizul Parlamentului European ⁽²⁾,

având în vedere avizul Comitetului Economic și Social ⁽³⁾,

întrucât producția de cartofi ocupă un loc important în agricultura Comunității; întrucât producția de cartofi este amenințată constant de organismele dăunătoare;

întrucât prin protejarea culturilor de cartofi împotriva acestor organisme trebuie să se mențină nu doar capacitatea de producție, ci și o productivitate agricolă sporită;

întrucât măsurile de protecție pentru prevenirea introducerii organismelor dăunătoare în fiecare stat membru ar avea doar un efect limitat, în cazul în care aceste organisme nu se combat simultan și metodic în întreaga Comunitate și dacă nu se împiedică răspândirea lor;

întrucât unul dintre organismele cele mai dăunătoare pentru cartofi este *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. subspecia

sepedonicus (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., agentul patogen al veștejirii bacteriene a cartofului; întrucât această boală a apărut în mai multe părți ale Comunității și există încă câteva surse limitate de infecție;

întrucât există un risc considerabil pentru culturile de cartofi la nivelul întregii Comunități, dacă nu se întreprind măsuri efective de localizare a acestei boli și de stabilire a distribuției sale pentru a preveni apariția și răspândirea acesteia și a o controla în scopul eradicării;

întrucât, pentru a asigura acest lucru, trebuie luate anumite măsuri în cadrul Comunității; întrucât statele membre trebuie să adopte și măsuri complementare sau mai stricte dacă este necesar, cu condiția să nu fie împiedicată circulația cartofilor în cadrul Comunității, exceptând cele stabilite prin Directiva 77/93/CEE a Consiliului din 21 decembrie 1976 privind măsurile de protecție împotriva introducerii în statele membre a organismelor dăunătoare plantelor sau produselor din plante ⁽⁴⁾; întrucât aceste măsuri trebuie să fie comunicate celorlalte state membre și Comisiei;

întrucât Directiva 80/665/CEE a Consiliului din 24 iunie 1980 privind combaterea veștejirii bacteriene a cartofului ⁽⁵⁾ stabilește măsurile minime pe care trebuie să le întreprindă statele membre împotriva acestei boli;

⁽¹⁾ JO C 93, 2.4.1993, p. 12.

⁽²⁾ JO C 176, 28.6.1993, p. 210.

⁽³⁾ JO C 161, 14.6.1993, p. 18.

⁽⁴⁾ JO L 26, 31.1.1977, p. 20. Directivă modificată ultima dată prin Directiva 92/103/CEE a Comisiei (JO L 363, 11.12.1992, p. 1).

⁽⁵⁾ JO L 180, 14.7.1980, p. 30.

întrucât de atunci s-au înregistrat progrese semnificative privind înțelegerea veștejirii bacteriene a cartofului și detectarea agentului patogen al acesteia;

întrucât aplicarea regimului fitosanitar comunitar întregii Comunități ca zonă fără frontiere interne a necesitat reexaminarea și revizuirea anumitor dispoziții ale Directivei 80/665/CEE;

întrucât, ca rezultat al unei asemenea reexaminări, s-a constatat că dispozițiile Directivei 80/665/CEE sunt insuficiente și că trebuie formulate măsuri complementare;

întrucât, în această situație, Directiva 80/665/CEE trebuie să fie abrogată și să se adopte măsurile necesare;

întrucât măsurile trebuie să țină seama, în primul rând, că boala poate rămâne latentă și neobservată atât în planta care se dezvoltă, cât și în tuberculii depozitați, putând fi astfel prevenită efectiv numai prin producerea și utilizarea de cartofi de sămânță neinfecțiați și, în al doilea rând, că sunt necesare controale oficiale sistematice pentru localizarea acesteia; întrucât răspândirea agentului patogen în planta în creștere nu este cel mai important factor, dat fiind că agentul patogen poate rezista iarna în plante de cartof provenite din tuberculi uitați (plante denumite spontane) și că acestea reprezintă sursa majoră de infecție transmisă de la un anotimp la altul; întrucât agentul patogen se răspândește în principal prin contaminarea cartofilor ca urmare a contactului cu alți cartofi infecțiați și prin contactul cu echipamentul de plantare, recoltare și manipulare sau cu containerele de transport și depozitare contaminate cu organismul respectiv prin contactul anterior cu alți cartofi infecțiați; întrucât asemenea obiecte contaminate pot reprezenta o sursă de infecție o anumită perioadă de timp după contaminare; întrucât răspândirea agentului patogen poate fi redusă sau prevenită prin dezinfectarea acestor obiecte; întrucât orice contaminare a cartofilor de sămânță prezintă un risc major de răspândire a agentului patogen;

întrucât, pentru a se putea stabili modalitatea de aplicare a acestor măsuri generale, cât și a celor mai stricte sau complementare luate de către statele membre pentru prevenirea introducerii agentului patogen pe teritoriul lor, este de dorit ca statele membre să colaboreze îndeaproape cu Comisia, în cadrul Comitetului fitosanitar permanent (în continuare numit „comitet”),

ADOPTĂ PREZENTA DIRECTIVĂ:

Articolul 1

Prezenta directivă privește măsurile care trebuie întreprinse în cadrul statelor membre împotriva *Clavibacter michiganensis* (Smith)

Davis et al. subspecia *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) *Davis et al.*, cauza veștejirii bacteriene a cartofului (în continuare numit „organismul”) pentru:

- (a) a localiza și identifica distribuția sa;
- (b) a preveni apariția și răspândirea sa; și
- (c) în cazul în care este descoperit, pentru a împiedica răspândirea și pentru a-l combate în scopul eradicării.

Articolul 2

(1) Statele membre efectuează controale oficiale sistematice de detectare a organismului pe tuberculi și, dacă este cazul, pe plantele de cartofi (*Solanum tuberosum* L.) provenite de pe teritoriul lor, pentru confirmarea absenței organismului.

În scopul acestor controale, în cazul tuberculilor, se prelevează mostre de cartofi de sămânță și de alt fel, de preferință din loturi depozitate și supuse testelor de laborator oficiale sau monitorizate oficial, care utilizează metoda stabilită în anexa I pentru detectarea și diagnosticarea organismului. În plus, dacă este cazul, se pot efectua inspecții vizuale oficiale sau monitorizate oficial prin tăierea altor mostre de tuberculi.

În cazul plantelor, aceste controale se efectuează în conformitate cu metodele adecvate, iar mostrele sunt supuse unei testări oficiale sau monitorizate oficial.

Numărul, originea, stratificarea și perioada prelevării mostrelor trebuie să fie decise de instituțiile oficiale responsabile în sensul Directivei 77/93/CEE, întemeiate pe principii statistice și științifice sănătoase și pe biologia organismului, ținând cont de sistemele de producție speciale ale statele membre respective. Modalitatea de aplicare este prezentată anual celorlalte state membre și Comisiei în vederea asigurării unor niveluri de siguranță comparabile între statele membre pentru confirmarea absenței organismului.

(2) Rezultatele controalelor oficiale prevăzute la alineatul (1) se comunică, cel puțin o dată pe an, celorlalte state membre și Comisiei. Detaliile acestei comunicări sunt confidențiale. Ele sunt prezentate Comitetului în conformitate cu procedura stabilită la articolul 16a din Directiva 77/93/CEE.

(3) Se pot adopta următoarele dispoziții în conformitate cu procedura stabilită la articolul 16a din Directiva 77/93/CEE:

- detaliile controalelor prevăzute la alineatul (1) de mai sus se aplică potrivit unor principii științifice și statistice sănătoase,
- detaliile comunicării prevăzute la alineatul (2) de mai sus.

(4) Următoarele dispoziții se adoptă în conformitate cu procedura stabilită la articolul 16a din Directiva 77/93/CEE:

— metoda adecvată pentru controalele și testarea prevăzute la al treilea paragraf din alineatul (1) de mai sus.

Articolul 3

Statele membre se asigură că prezența suspectată sau confirmată a organismului în plante și tuberculi sau în tuberculii recoltați, înmagazinați sau comercializați pe teritoriul lor este raportată propriilor instituții oficiale responsabile.

Articolul 4

(1) În cazul unei apariții suspectate, agențiile oficiale responsabile din statele în care aceste cazuri au fost raportate asigură efectuarea testelor de laborator oficiale sau monitorizate oficial, utilizând metoda stabilită în anexa I și în conformitate cu condițiile precizate la punctul 1 din anexa II pentru confirmarea sau respingerea apariției suspectate. În primul caz se aplică cerințele stabilite la punctul 2 din anexa II.

(2) În așteptarea confirmării sau infirmării apariției suspectate în conformitate cu alineatul (1), în acele cazuri de apariție suspectă în care:

- (i) au fost văzute simptome vizuale ale unui diagnostic suspect sau
- (ii) a fost identificat un test pozitiv de imunofluorescență în conformitate cu anexa I sau un alt test pozitiv adecvat,

agențiile oficiale competente ale statelor membre:

- (a) interzic circulația tuturor loturilor sau transporturilor din care s-au prelevat mostre, cu excepția celor aflate sub controlul lor și cu condiția de a se stabili că nu există nici un risc identificabil de răspândire a organismului;
- (b) iau măsuri de depistare a originii apariției suspectate;
- (c) introduc măsuri de precauție complementare bazate pe un nivel de risc estimat pentru prevenirea răspândirii organismului. Aceste măsuri pot include controlul oficial al circulației tuberculilor sau plantelor în cadrul sau în afara incintelor asociate cu apariția suspectată.

(3) În conformitate cu procedura stabilită la articolul 16a din Directiva 77/93/CEE se poate adopta dispoziția următoare:

— măsurile prevăzute la alineatul (2) litera (c) de mai sus.

(4) În conformitate cu procedura stabilită la articolul 16a din Directiva 77/93/CEE se poate adopta dispoziția următoare:

— celălalt test adecvat prevăzut la alineatul (2) punctul (ii) de mai sus.

Articolul 5

(1) În cazul în care teste de laborator oficiale sau monitorizate oficial care utilizează metoda stabilită în anexa I confirmă prezența organismului într-o mostră de tuberculi, plante sau părți de plante, agențiile oficiale ale statului membru respectiv, având în vedere principiile științifice sănătoase, biologia organismului și sistemele speciale de producție, comercializare și prelucrare din statul membru respectiv:

- (a) desemnează ca fiind contaminați tuberculii sau plantele, transportul și/sau lotul și utilajul, vehiculele, containerele, depozitele sau părți din acestea și oricare alte obiecte, inclusiv materialul de ambalare din care s-a prelevat o mostră și, dacă este cazul, locul (locurile) producției și câmpul (câmpurile) de unde au fost recoltați tuberculii sau plantele;
- (b) stabilesc, luând în considerare dispozițiile punctului 1 din anexa III, gradul de contaminare probabilă prin contact la pre sau post recoltare sau prin legătura producției cu contaminarea desemnată;
- (c) demarchează o zonă pe baza stabilirii contaminării conform literei (a), stabilesc gradul de contaminare probabilă conform literei (b) și posibilă răspândire a organismului ținând seama de dispozițiile punctului 2 din anexa III.

(2) Statele membre comunică imediat celorlalte state membre și Comisiei, în conformitate cu dispozițiile de la punctul 3 din anexa III, orice contaminare desemnată în conformitate cu alineatul (1) litera (a) și detaliile demarcării zonei potrivit alineatului (1) litera (c).

Detaliile acestor comunicări sunt confidențiale. Ele pot fi prezentate Comisiei în conformitate cu procedura stabilită la articolul 16a din Directiva 77/93/CEE.

(3) În urma comunicării în conformitate cu alineatul (2) și a elementelor menționate, alte state membre detaliate în comunicare desemnează, dacă este cazul, contaminarea, stabilesc gradul de contaminare probabil și demarchează o zonă în conformitate cu alineatul (1) literele (a), (b) și respectiv (c).

Articolul 6

Statele membre stipulează că, dacă tuberculii sau plantele au fost desemnate ca fiind contaminate în conformitate cu articolul 5 alineatul (1) litera (a), se efectuează, potrivit articolului 4 alineatul (1), teste pe stocurile de cartofi care au clone înrudite cu cei contaminați. Se efectuează teste pe oricât de mulți tuberculi sau plante este nevoie pentru a se stabili sursa primară de infecție probabilă și gradul contaminării probabile, preferabil în ordinea gradului de risc.

În urma testării, se efectuează, după caz, o altă desemnare a contaminării, determinarea gradului contaminării probabile și demarcarea unei zone, în conformitate cu articolul 5 alineatul (1) literele (a), (b) și respectiv (c).

Articolul 7

(1) Statele membre stipulează că tuberculii sau plantele desemnate ca fiind contaminate în conformitate cu articolul 5 alineatul (1) litera (a) nu pot fi plantate și că, sub controlul agențiilor oficiale responsabile, aceștia:

- sunt distruși sau
- eliminați într-un alt mod, potrivit unor măsuri de monitorizare oficiale, în conformitate cu dispozițiile punctului 1 din anexa IV, cu condiția de a se stabili că nu există un risc identificabil de răspândire a organismului.

(2) Statele membre stipulează că tuberculii sau plantele desemnate ca fiind contaminate în conformitate cu articolul 5 alineatul (1) litera (b) nu pot fi plantați și, fără a aduce atingere rezultatului testării menționate la articolul 6 pentru stocurile înrudite clonal, sunt supuși controlului propriilor agenții oficiale responsabile, în vederea unei utilizări adecvate sau distrugerii în conformitate cu punctul 2 din anexa IV, în așa fel încât să se stabilească că nu există un risc identificabil de răspândire a organismului.

(3) Statele membre stipulează că toate utilajele, vehiculele, containerele, depozitele sau părți din acestea sau oricare alte obiecte, inclusiv materialul de ambalare, desemnate ca fiind contaminate în conformitate cu articolul 5 alineatul (1) litera (a) sau stabilite a fi probabil contaminate în conformitate cu articolul 5 alineatul (1) litera (b) sunt fie distruse, fie curățate și dezinfectate prin utilizarea de metode adecvate, după cum se precizează la punctul 3 din anexa IV. După dezinfecție, toate aceste obiecte nu mai sunt considerate a fi contaminate.

(4) Fără a aduce atingere măsurilor puse în aplicare în conformitate cu alineatele (1), (2) și (3), statele membre stipulează că, în zona demarcată în conformitate cu articolul 5 alineatul (1) litera (c), se aplică o serie de măsuri, după cum se menționează la punctul 4 din anexa IV.

Articolul 8

(1) Statele membre stipulează pentru cartofii de sămânță că aceștia trebuie să îndeplinească cerințele Directivei 77/93/CEE și că trebuie să provină direct din materialul obținut printr-un program aprobat oficial, despre care s-a constatat că nu conține organismul, în urma unei testări oficiale sau monitorizate oficial bazate pe utilizarea metodei prezentate în anexa I.

Testarea menționată anterior se efectuează:

- în cazul în care contaminarea afectează producția de cartofi de sămânță, în cazul plantelor din selecția clonală inițială;
- în alte cazuri, fie pe plantele din selecția clonală inițială, fie pe mostre reprezentative din cartofi de sămânță de bază sau din propagări timpurii.

(2) Se pot adopta următoarele dispoziții în conformitate cu procedura stabilită la articolul 16a din Directiva 77/93/CEE:

- normele de aplicare a alineatului (1) din prezentul articol, al doilea paragraf, prima liniuță,
- normele privind mostrele reprezentative prevăzute la alineatul (1) din prezentul articol, al doilea paragraf, a doua liniuță.

Articolul 9

Statele membre interzic deținerea și manipularea organismului.

Articolul 10

Fără să aducă atingere dispozițiilor Directivei 77/93/CEE, statele membre pot autoriza derogări de la măsurile menționate la articolele 6, 7 și 9 ale prezentei directive, în scopuri experimentale sau științifice și pentru lucrări de selecție a soiurilor, cu condiția ca aceste derogări să nu prejudicieze combaterea organismului și să nu creeze riscul răspândirii acestuia.

Articolul 11

Statele membre pot adopta măsuri complementare sau mai stricte, dacă este cazul, în scopul combaterii organismului sau a prevenirii răspândirii acestuia, dacă sunt în conformitate cu dispozițiile Directivei 77/93/CEE.

Măsurile complementare menționate la primul paragraf pot include prevederea plantării doar a cartofilor de sămânță care sunt fie omologați oficial, fie controlați oficial, în vederea respectării standardelor fitosanitare necesare. Cele din urmă se aplică în special în cazul fermierilor autorizați să utilizeze, pe exploatațile agricole proprii, cartofi de sămânță obținuți din recolta proprie și, în alte cazuri, să planteze numai cartofi de sămânță din producția proprie.

Detaliile acestor măsuri se comunică celorlalte state membre și Comisiei.

Articolul 12

Modificările anexelor la prezenta directivă, care urmează a fi făcute având în vedere progresele științifice sau tehnice, se adoptă în conformitate cu procedura stabilită la articolul 16a din Directiva 77/93/CEE.

Articolul 13

(1) Până la 15 noiembrie 1993, statele membre adoptă și publică dispozițiile necesare pentru a se conforma prezentei directive. Ele informează de îndată Comisia cu privire la aceasta.

Atunci când statele membre adoptă prezentele dispoziții, acestea conțin o trimitere la prezenta directivă sau sunt însoțite de o astfel de trimitere în momentul publicării lor oficiale. Statele membre stabilesc modalitatea de efectuare a acestei trimiteri.

Statele membre aplică aceste dispoziții începând cu data de 16 noiembrie 1993.

(2) Statele membre comunică de îndată Comisiei toate dispozițiile de drept intern pe care le adoptă în domeniul reglementat de prezenta directivă. Comisia informează celelalte state membre cu privire la aceasta.

Articolul 14

Directiva 80/665/CEE se abrogă cu începere de la 16 noiembrie 1993.

Articolul 15

Prezenta directivă se adresează statelor membre.

Adoptată la Luxemburg, 4 octombrie 1993.

Pentru Consiliu,

Președintele,

W. CLAES

ANEXA I

**METODE DE DETECTARE ȘI DIAGNOSTICARE A BACTERIEI VEȘTEJIRII BACTERIENE A
CARTOFULUI, CLAVIBACTER MICHIGANENSIS (Smith) Davis et al. subspecia SEPEDONICUS
(Spieckermann et Kotthoff) Davis et al. PE LOTURI DE TUBERCULI DE CARTOF**

1. Îndepărtarea miezurilor terminale

- 1.1. Se spală 200 de tuberculi în apă de la robinet și se îndepărtează epiderma din jurul capătului fiecărui tubercul folosind un scalpel dezinfectat periodic sau un cuțit de curățat cartofi; dezinfecția se poate face prin imersia cuțitului într-o soluție de etanol 70 % și flambare.
- 1.2. Se îndepărtează cu grijă miezurile cu țesut conic terminale cu un scalpel sau un cuțit de curățat cartofi. Se menține excesul de țesut nevascular la minimum. După îndepărtare, extremitățile se prelucrează în termen de 24 de ore [vezi alineatul (3)] sau se conservă la -20 °C pentru maximum două săptămâni.

2. Examinarea vizuală pentru descoperirea simptomelor veștejirii bacteriene

După îndepărtarea extremităților, se taie transversal fiecare tubercul și se observă simptomele veștejirii bacteriene.

Se storc tuberculii și se urmăresc țesuturile macerate din țesutul vascular.

Cele mai timpurii simptome sunt un țesut ușor sticlos sau translucid fără o înmuiere în jurul sistemului vascular, în special lângă extremități. Inelul vascular de la extremitate poate avea o culoare mai închisă decât este normal. Primul simptom identificabil imediat este colorația gălbuie a inelului vascular și faptul că atunci când tuberculul este stors ușor din vase țâșnesc picături de material brânzos. Acest exudat conține milioane de bacterii. În acest moment se poate produce o colorare brună a țesutului vascular. La început, aceste simptome pot să apară numai într-o parte a inelului, nu neapărat în apropierea extremității și se pot extinde treptat la întregul inel. Pe măsură ce infecția progresează, se produce distrugerea țesutului vascular; cortexul exterior se poate separa de cel interior. În stadiile avansate ale infecției, apar crăpături la suprafața tuberculului, care adeseori au culoare roșietică-cafenie la extremități. Simptomele pot fi mascate de o invazie spongioasă sau bacteriană și poate fi dificil, dacă nu imposibil, să se distingă simptomele avansate ale veștejirii bacteriene de celelalte veștejiri ale tuberculilor.

3. Pregătirea mostrelor pentru colorarea Gram, colorarea imunofluorescentă (IF) și testul vinetei

- 3.1. Se omogenizează extremitatea până la macerarea completă într-un diluant cunoscut ca fiind netoxic pentru *Corynebacterium sepedonicum* (de exemplu, sare de fosfat tamponată (SFT) de 0,05 M și pH 7,0), la o temperatură de sub 30 °C; se recomandă adăugarea unui peptizant netoxic și a unui agent antispumant netoxic (apendicele 1 și 2). Trebuie evitată o macerare excesivă.
- 3.2. Se extrag bacteriile din amestecul omogen printr-una dintre metodele următoare ⁽¹⁾:
- A. (a) Centrifugare la maximum 180 g timp de 10 minute.
- (b) Centrifugare supranatantă la minimum 4 000 g timp de 10 minute. Supranatantul se decantează și se aruncă.
- B. (a) Se lasă maceratul în repaus timp de 30 de minute pentru ca resturile de țesut să se poată depune. Se decantează supranatantul fără a tulbura sedimentul.
- (b) Filtrare a supranatantului printr-un filtru de hârtie (Whatman nr. 1) ținut într-un filtru de sticlă sinterizată (nr. 2 = 40–100 μm) folosind o pompă de apă. Se colectează filtratul într-un tub centrifugal. Se spală filtrul cu steril de sare de fosfat tamponată, până la un volum maxim al filtratului de 35 ml.
- (c) Centrifugare a filtratului la minimum 4 000 g timp de 20 de minute.
- 3.3. Se suspendă granulele în steril de fosfat tamponat de 0,01 M și pH 7,2 (apendice 2) pentru a se obține un volum total de aproximativ 1 ml. Se face divizarea în două părți egale și se păstrează o parte ca martor, prin congelare la -20 °C ⁽²⁾ sau prin liofilizare. Cealaltă parte se divizează în două jumătăți, utilizând una pentru testul IF și colorarea Gram și cealaltă pentru testul vinetei.

⁽¹⁾ O metodă de extracție alternativă este dată de Dinesen, 1984.

⁽²⁾ Există dovada (Janse și Van Vaerenberg, 1987) că prin congelare se poate reduce viabilitatea lui *Corynebacterium sepedonicum*. Suspensia granulei în 10 % glicerol poate rezolva problema.

- 3.4. Este imperativ ca toate controalele pozitive *C. sepedonicum* și mostrele să fie tratate separat, pentru evitarea contaminării. Aceasta se aplică lamelor IF și testelor vinetei.

4. Colorarea Gram

- 4.1. Se prepară colorații Gram pentru toate diluțiile granulelor (5.2.1) și pentru tuberculii tăiați (2) care au un aspect sticios, de veștejire sau alte simptome suspecte. Mostrele se prelevează de pe marginea țesuturilor bolnave.
- 4.2. Se prepară colorațiile Gram pentru culturile cunoscute ale *C. sepedonicum* și, dacă este posibil, pentru țesuturile infectate (5.1).
- 4.3. Se determină care mostre conțin celule corineforme Gram pozitive tipice. În general, celulele *C. sepedonicum* au o lungime de 0,8 până la 1,2 μm și o lățime de 0,4 până la 0,60 μm .

În apendicele 3 se indică un procedeu de colorare adecvat.

Preparatele din infecții naturale sau culturi recent izolate prezintă adesea o predominanță de tulpini cocoide, care sunt de obicei mai mici decât celulele din culturile agar-agar. În majoritatea mediilor de cultură, celulele *C. sepedonicum* sunt tulpini corineforme pleomorfe și pot da o reacție Gram variabilă. Celulele sunt unice, în perechi, cu „coturi” caracteristice tipice pentru divizarea prin îndoire, și, ocazional, în grupuri neregulate, descrise ca palisade și litere chinezești.

5. Protocol pentru testarea IF

- 5.1. Se utilizează antiser pentru o colorație cunoscută a *C. sepedonicum* – ATCC 33113 (NCPB 2137) sau NCPB 2140. Aceasta trebuie să aibă un titru IF mai mare de 1:600. Se include un control SFT pe lamela de testare pentru a se determina dacă imunoglobulina izotiocianat fluorescent anti-*iepure* conjugată (FITC) se combină nespecific cu celulele bacteriale. *Corynebacterium sepedonicum* [ATCC 33113 (NCPB 2137), NCPB 2140] trebuie utilizată pentru controale omoloage antigen pe o lamelă separată. Țesutul infectat natural (conservat prin liofilizare sau congelare la -20 °C) se utilizează, dacă este posibil, ca un control similar pe aceeași lamelă (figura 2).
- 5.2. *Procedul*
- 5.2.1. Se prepară trei serii de diluții înzecite (10^1 , 10^2 , 10^3) din granula finală în apă distilată (figura 1).
- 5.2.2. Se picură cu pipeta un volum standard suficient pentru a acoperi fereastra (aproximativ 25 μl) din fiecare diluție a granulei sau a suspensiei *C. sepedonicum* (aproximativ 10^6 celule/ml) în ferestre pe o lamelă cu spoturi multiple, după cum se prezintă în figura 1.

Figura 1

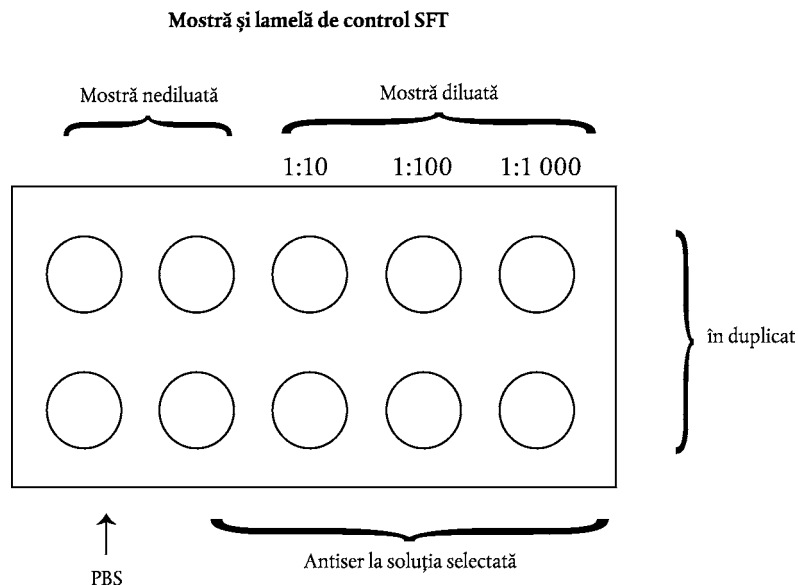
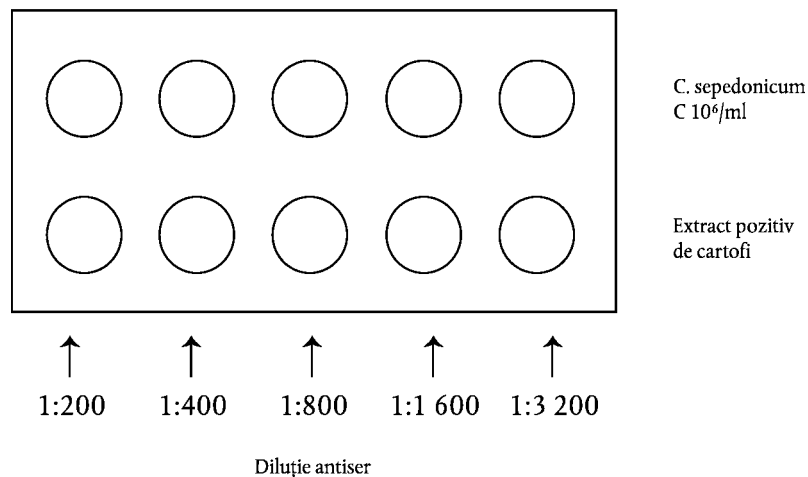


Figura 2

Lamelă de control pozitiv



- 5.2.4. Se acoperă ferestrele adecvate cu antiser *C. sepedonicum* la diluțiile recomandate, SFT de 0,01 M și pH 7,2 (apendice 2) conform figurii 1. (Se utilizează SFT pentru controlul FITC). Diluția activă a antiserului trebuie să fie aproximativ jumătate din titlul IF. Dacă trebuie incluse alte diluții antiser, se pregătesc lamele separate pentru fiecare diluție ce urmează a fi utilizată.
- 5.2.5. Se incubează într-o cameră umedă, la temperatura ambiantă, timp de 30 de minute.
- 5.2.6. Se clătește cu grijă cu SFT de 0,01 M și pH 7,2. Se spală timp de 5 minute în trei reprize de SFT 0,01 M și pH 7,2.
- 5.2.7. Se elimină cu grijă excesul de umezeală.
- 5.2.8. Se acoperă fiecare fereastră cu FITC conjugată în aceeași diluție utilizată pentru determinarea titlului și se incubează într-o cameră umedă întunecoasă, la temperatura ambiantă, timp de 30 de minute.
- 5.2.9. Se clătește și se spală ca mai înainte.
- 5.2.10. Se aplică aproximativ 5 până la 10 μ l de glicerină de fosfat tamponată 0,1 M cu pH 7,6 (sau o valoare similară cu un pH de minimum 7,6) în fiecare fereastră și se acoperă cu sticlă (apendice 2).
- 5.2.11. Se examinează cu un microscop prevăzut cu o sursă de lumină epifluorescentă și filtre adecvate FITC. Este indicată o mărire de 400 până la 1 000. Se scanează ferestrele replici peste două diametre în unghiuri drepte și în jurul perimetrelor ferestrelor.

Se observă celulele fluorescente din controalele pozitive și se determină titrul. Se observă celulele fluorescente din fereastra de control FITC/SFT și, dacă acestea sunt absente, atunci se continuă cu ferestrele de testare. Se determină în minimum 10 câmpuri microscopice numărul mediu de celule fluorescente tipice morfologic per câmp și se calculează numărul pe mililitru al granulei nediluate (apendice 4).

Există mai multe probleme inerente testului de imunofluorescență.

- În granulele de cartof pot apărea populații de fond de celule fluorescente cu morfologie atipică și bacteriile saprofite cu reacție încrucișată de mărime și morfologie similare lui *Clavibacter michiganensis* subspecia *sepedonicus*. Se iau în considerare numai celulele fluorescente cu mărime și morfologie tipice.

Din cauza posibilității producerii unor reacții încrucișate, mostrele cu un test de imunofluorescență pozitiv trebuie să fie retestate utilizându-se un antiser diferit.

- Limita tehnică de detecție a acestei metode se situează între 10^3 și 10^4 celule pe ml de granulă nediluată. Mostrele cu un număr de celule tipice IF la limita detecției sunt de obicei negative în cazul *C. m.* subspecia *sepedonicus*, dar pot fi supuse testului vinetei.

Se identifică un test de imunofluorescență negativ pentru toate mostrele la care nu se descoperă celule fluorescente cu morfologie tipică. Mostrele sunt considerate ca „necontaminate” cu *Clavibacter michiganensis* subspecia *sepedonicus*.

Testul vinetei nu este necesar.

Se identifică un test de imunofluorescență pozitiv pentru toate mostrele la care nu se descoperă celule fluorescente cu morfologie tipică.

Mostrele la care s-a identificat un test de imunofluorescență pozitiv cu ambele antiseruri sunt considerate ca „potențial contaminate” cu *Clavibacter michiganensis* subspecia *sepedonicus*.

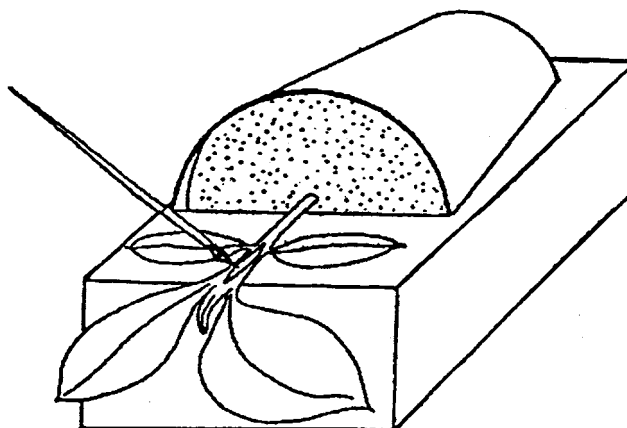
Testul vinetei este necesar pentru toate mostrele considerate a fi potențial contaminate.

6. Testul vinetei

Pentru detalii de cultură, a se vedea apendicele 5.

- 6.1. Se distribuie granula de la 3.3 la cel puțin 25 de vinete aflate în al treilea stadiu de înfrunzire (apendice 5) printr-una dintre metodele indicate mai jos (6.2, 6.3 sau 6.4).
- 6.2. *Inoculare prin tăiere I*
 - 6.2.1. Se sprijină fiecare ghiveci pe orizontală [un bloc din polistiren expandat, cu o bucată cu dimensiunile de 5 cm x 10 cm x 15 cm (HxLxL) desprinsă din suprafață (figura 3) este adecvat pentru un ghiveci de 10 cm]. Între tulpină și bloc se amplasează o folie de aluminiu sterilă pentru fiecare mostră testată. Planta este fixată în jurul blocului cu o bandă de cauciuc.
 - 6.2.2. Utilizând un scalpel, se execută o tăietură longitudinală sau ușor diagonală de 0,5 până la 1 cm lungime și cu o adâncime de aproximativ trei pătrimi din diametrul tulpinii, între cotiledoane și prima frunză.
 - 6.2.3. Se ține deschisă tăietura cu vârful lamei scalpelului și se badijonează altoiul cu un creion de machiat sau cu o periuță fină încărcată cu granula respectivă. Se distribuie restul granulei la celelalte vinete.
 - 6.2.4. Se închide tăietura cu vaselină sterilă cu o seringă de 2 ml.

Figura 3



- 6.3. *Inoculare prin tăiere II*
 - 6.3.1. Se ține planta între două degete și se picură cu pipeta (circa 5 până la 10 μl) din granula în suspensie pe tulpină, între cotiledoane și prima frunză.
 - 6.3.2. Utilizând un scalpel steril, se execută o tăietură diagonală (într-un unghi de aproximativ 5°), cu o lungime de 1,0 cm și o adâncime de aproximativ 2/3 din grosimea tulpinii, tăietura începând de la picătura de granulă.
 - 6.3.3. Se închide tăietura cu vaselină sterilă cu ajutorul unei seringi.
- 6.4. *Inoculare prin seringă*
 - 6.4.1. Vinetele nu se udă cu o zi înaintea inoculării pentru a reduce presiunea turgor.

- 6.4.2. Se inoculează tulpinile de vânăță exact deasupra cotiledoanelor, folosind o seringă cu ac hipodermic (de minimum 23G). Se distribuie granula la vinetele respective.
- 6.5. Se inoculează 25 de vinete cu o cultură cunoscută de *C. sepedonicum* și, dacă este posibil, cu un țesut de tubercul infectat (5.1) prin aceeași metodă de inoculare (6.2, 6.3 sau 6.4).
- 6.6. Se inoculează 25 de vinete cu SFT steril de 0,05 M prin aceeași metodă de inoculare (6.2, 6.3 sau 6.4).
- 6.7. Vinetele se incubează în condiții adecvate (apendice 5) timp de 40 de zile. Se examinează regulat simptomele după opt zile. Se numără vinetele care prezintă simptome. *C. sepedonicum* cauzează ofilirea frunzelor vinetelor, care poate începe ca o flaciditate marginală sau intervenală. Țesutul ofilit poate să aibă inițial o culoare verde închis sau pestriță, dar care devine mai pală înainte de necrozare. Ofilirile intervenale au adesea un aspect unsuros apos. Țesutul necrozat are adeseori o margine galben-strălucitor. Vinetele nu mor neapărat; cu cât este mai îndelungată perioada care precede apariția simptomelor, cu atât cresc șansele de supraviețuire. Vinetele pot învinge infecția. Vinetele tinere susceptibile sunt mult mai sensibile la populațiile reduse de *C. sepedonicum* decât plantele mai bătrâne, de unde necesitatea de a utiliza vinete aflate în al treilea stadiu de înfrunzire sau exact înaintea acestuia.

Ofilirile pot fi provocate, de asemenea, de populații de alte bacterii sau ciuperci prezente în granula de țesut de tubercul. Acestea includ *Erwinia carotovora*, subspecia *carotovora* și *E. carotovora* subspecia *atroseptica*, *Phoma exigua* varietatea *foveata*, precum și de populații mari de bacterii saprofite. Aceste ofiliri pot fi deosebite de cele cauzate de *C. sepedonicum* deoarece toate frunzele sau întreaga vânăță se ofilesc rapid.

- 6.8. Se prepară o colorație Gram (4) pentru toate loturile de vinete care prezintă simptome, utilizând secțiuni de țesut de frunză ofilită și de tulpină de vânăță, și se izolează într-un mediu nutritiv adecvat (7). Se dezinfectează frunzele vinetelor și tulpinile prin ștergere cu o soluție de etanol 70 %.
- 6.9. În anumite cazuri, în special dacă condițiile de creștere nu sunt optime, este posibil ca *C. sepedonicum* să existe ca o infecție latentă în vinete, chiar după incubarea de 40 de zile. Aceste infecții pot avea ca rezultat ofilirea și pierderea vigoriei vinetelor inoculate. Dacă testul IF este considerat pozitiv, se poate considera că este necesară o testare suplimentară. Este, așadar, esențial să se compare ratele de creștere ale tuturor plantelor supuse testului vinetei cu controalele inoculate cu SFT steril de 0,05 M și să se monitorizeze condițiile de mediu ale serei.

Recomandările pentru teste ulterioare sunt următoarele:

- 6.9.1. se taie tulpinile deasupra locului inoculării și se îndepărtează frunzele;
- 6.9.2. se macerează tulpinile în SFT de 0,05 M și pH 7,0 ca la 3.1 până la 3.2;
- 6.9.3. se utilizează o jumătate de granulă pentru a efectua o colorație Gram (4) și un test IF (5);
- 6.9.4. se utilizează cealaltă jumătate pentru un nou test al vinetei (6), dacă colorația Gram și/sau testele IF sunt pozitive. Se folosește o cultură cunoscută *C. sepedonicum* și controale sterile de SFT 0,05 M. Dacă nu se observă simptome în testul ulterior, mostra este considerată negativă.

7. Izolarea *C. sepedonicum*

Diagnosticul poate fi confirmat doar dacă *C. sepedonicum* este izolat și identificat ca atare (8). Deși *C. sepedonicum* este un organism dificil, el poate fi izolat din țesutul simptomatic. Totuși, el poate fi depășit prin cultivarea rapidă de bacterii saprofite și de aceea izolarea directă din granula de țesut de tubercul (3.3) nu este recomandată. Vinetele asigură un mediu de îmbogățire excelent pentru dezvoltarea lui *C. sepedonicum* și, de asemenea, permit realizarea unui excelent test de confirmare pe gazdă.

Se fac izolări din toți tuberculii de cartof simptomatici și vinete (4, 6). Dacă este necesar, macerarea tulpinilor vinetelor se face ca la 3 și 6.9.

7.1. Înșiruiți suspensii într-unul dintre următoarele medii: (formulele sunt indicate în apendicele 6):

dextroză agar nutritivă (numai pentru subculturi),

drojdie de glucoză peptidică agar,

drojdie de dextroză agar nutritivă,

drojdie de extract de săruri minerale agar.

Se incubează la 21 °C timp de maximum 20 de zile.

C. sepedonicum crește încet, producând de obicei colonii cu un vârf ascuțit, cremos, de forma unei cupole, în termen de 10 zile.

Reînșiruiți pentru stabilirea purității.

Ratele de creștere sunt îmbunătățite prin subculturi. Coloniile tipice sunt de un alb cremos sau ivoriu, rotunde, netede, înălțate, cu formă de dom convex, mucoid fluidale, cu margini întregi și cu un diametru uzual de 1 până la 3 mm.

Identificarea

Multe bacterii corineforme Gram pozitive, cu caractere coloniale similare celor ale lui *C. sepedonicum*, pot fi izolate din cartofi și vinete sănătoase sau bolnave. În acest context, *C. sepedonicum* poate fi identificat prin următoarele teste:

testul IF (5.1);

testul vinetei;

testele de nutriție și fiziologice (apendice 7);

— testul oxidării/fermentării (O/F);

— testul oxidazei;

— creșterea la 37 °C;

— producția de urează;

— hidroliza esculinei;

— hidroliza amidonului;

— toleranța la o soluție de clorură de sodiu 7 %;

— testul indolului;

— testul catalazei;

— producția de H₂S;

— utilizarea citratului;

— hidroliza gelatinei;

— acid din: glicerol, lactoză, ramnoză și salicin;

— colorarea Gram.

Toate testele trebuie să includă un control cunoscut *C. sepedonicum*. Testele nutriționale și fiziologice se fac utilizând inoculări din subculturile agar nutritive. Comparațiile morfologice se fac din culturi de dextroză agar nutritive.

Pentru testul IF, populațiile de celule trebuie să fie ajustate la 10⁶ celule/ml. Titrul IF trebuie să fie similar celui al culturii *C. sepedonicum* cunoscute.

Pentru testul vinetei, populațiile de celule trebuie să fie ajustate la 10⁷ celule/ml. Testele vinetei se fac utilizând zece plante pentru fiecare dintre organismele de testare, utilizând din nou cultura cunoscută *C. sepedonicum* și controale de apă sterilă; în cazul culturilor pure, ofilirea se obține în 20 de zile, dar plantele care nu prezintă simptome după această perioadă trebuie să fie incubate pe o durată totală de 30 de zile, la temperaturi care să determine dezvoltarea vinetelor, dar fără să depășească 30 °C (apendicele 5). Dacă după 30 de zile simptomele nu sunt prezente, cultura nu poate fi confirmată ca fiind o formă patogenică a lui *Corynebacterium sepedonicum*.

Testul	<i>C. sepedonicum</i>
O/F	Inert sau slab oxidativ
Oxidază	–
Catalază	+
Reducția nitraților	–
Activitatea ureazei	–
Producția de H ₂ S	–
Producția de indol	–
Utilizarea citraților	–
Hidroliza amidonului	– sau slab
Creșterea la 37°	–
Creșterea în soluție de NaCl 7 %	–
Hidroliza gelatinei	–
Hidroliza esculinei	+
Acid din:	
— glicerol	–
— lactoză	– sau slab
— ramnoză	–
— salicin	–

*Apendicele 1***FORMULA FLUIDULUI DE MACERARE RECOMANDAT DE LELLIOTT ȘI SELLAR, 1976**

Compus D C silicon MS A (Hopkins & Williams Ltd, Cat. Nr. 9964-25, Chadwell Heath, Essex, Anglia)	10 ml
Fulgi de lubrol W (ICI Ltd)	0,5 g
Pirofosfat de tetrasodiu	1 g
Sare fosfatică tamponată 0,05 M cu pH 7,0 (apendicele 2)	1 litru

Apendicele 2

SOLUȚII-TAMPON

Sare fosfatică tamponată 0,05 M cu pH 7,0

Această soluție-tampon poate fi folosită pentru macerarea țesuturilor de tuberculi (2.1)

Na ₂ HPO ₄	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
NaCl	8,0 g
Apă distilată până la	1 litru

Sare fosfatică tamponată de 0,01 M cu pH 7,2

Această soluție-tampon este utilizată pentru diluarea antiserurilor și spălarea lamelelor IF

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

Glicerină fosfatică tamponată de 0,1 M cu pH 7,6

Această soluție-tampon este utilizată pentru mărirea fluorescenței în cadrul testului IF

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

Apendicele 3

PROCEDEUL COLORĂRII GRAM (MODIFICAREA LUI HUCKER) (DOETSCH, 1981)**Soluție de cristale violete**

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

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

Se amestecă soluțiile.

Iodul Lugol

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

Solidele se pisează într-un mojar. Se adaugă apă și se amestecă până la dizolvare într-un recipient închis.

Soluția de contracolorare Safranin

Se alcătuieste soluția:

Safranin O	2,5 g
etanol 95 %	100 ml

Se amestecă și se depozitează.

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

Procedul de colorare

1. Se pregătesc frotiurile și dispozitivele de uscare și încălzire cu aer.
2. Se imersează lamela într-o soluție de violet cristalin timp de un minut.
3. Se spală cu apă de la robinet.
4. Se imersează în iod Lugol timp de un minut.
5. Se spală cu apă de la robinet și usucă cu un absorbant.
6. Se decolorează cu etanol 95 %, adăugat prin picurare, până când nu se mai îndepărtează culoarea sau se imersează prin agitare ușoară timp de 30 de secunde.
7. Se spală cu apă de la robinet și se usucă cu un absorbant.
8. Se imersează în soluție safranin timp de 10 secunde.
9. Se spală cu apă de la robinet și se usucă cu un absorbant.

Colorația bacteriilor Gram-pozitive este violet-albastră; bacteriile Gram-negative au o colorație roz-roșie.

Apendicele 4

DETERMINAREA POPULAȚIEI DE CELULE POZITIVE IF

Aria suprafeței (S) ferestrei lamelei multispot

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

Unde D = diametrul ferestrei

Aria suprafeței (s) câmpului obiectiv

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

unde d = diametrul câmpului.

Se calculează d prin măsurare directă sau prin formulele următoare:

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

unde i = coeficientul câmpului (depinde de tipul ocularului și variază de la 8 la 24)

K = coeficientul tubului (1 sau 1,25)

G = amplificarea de 100 × (40 × etc.) a obiectivului

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

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

Se numără celulele fluorescente tipice pe câmp (c).

Se calculează numărul celulelor fluorescente tipice pe fereastră (C).

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

Se calculează numărul celulelor fluorescente tipice pe ml de granulă (N).

$$N = C \times \frac{1000}{y} \times F$$

unde y = volumul granulei pe fereastră,

unde F = factorul de diluție a granulelor.

Apendicele 5

CULTURA VINETELOR

Se însămânțează semințe de vânăță (*Solanum melongena* cv. Black Beauty) într-un compost de semințe pasteurizat. Puieții cu cotiledoane deplin expandate (10 până la 14 zile) se răsădesc într-un compost de răsădire pasteurizat.

Se utilizează vinete în al treilea stadiu de înfrunzire, atunci când două dar nu mai mult de trei frunze sunt desfăcute complet.

Vinetele trebuie să fie cultivate într-o seră, în următoarele condiții de mediu:

durata zilei: 14 ore de lumină naturală sau mai mult;

temperatura: ziua: 21 până la 24 °C,

noaptea: 15 °C.

N.B.: *C. sepedonicum* nu crește la temperaturi de peste 30 °C. Dacă temperaturile nocturne nu scad la 15 °C, se poate produce deteriorarea cromoforului (necroza argintie).

Deteriorarea rădăcinii cauzate de larvele sciaride poate fi depășită prin aplicarea unui insecticid adecvat.

Vânăta Black Beauty poate fi obținută de la firmele următoare:

1. AB Hammenhögs Frö,
270 50 Hammenhög,
Sweden;
 2. HURST Seeds Ltd,
Avenue Road,
Witham,
Essex CM8 2DX,
England;
 3. ASGRO Italia Sp A,
Corso Lodi, 23,
Milan;
 4. KÜPPER
Mitteldeutsche Samen GmbH,
Hessenring 22,
D-37269 Eschwege.
-

Apendicele 6

MEDII PENTRU CREȘTEREA ȘI IZOLAREA C. SEPEDONICUM**Agar nutritiv (NA)**

Agar nutritiv difco bacto în apă distilată la standardul producătorului. Se sterilizează prin autoclavizare la 121 °C timp de 15 minute.

Dextroză nutritivă agar (NDA)

Agar nutritiv difco bacto cu un conținut de 1 % D(+) glucoză (monohidrat). Se sterilizează prin autoclavizare la 115 °C timp de 20 de minute.

Drojdie de glucoză peptidică agar (YPGA)

Extract de drojdie difco bacto (nr. 0127)	5 g
Peptonă difco bacto (nr. 0118)	5 g
D(+)- glucoză (monohidrat)	10 g
Agar purificat difco bacto (nr. 0560)	15 g
Apă distilată	1 litru

Se sterilizează câte 0,5 l prin autoclavizare la 115 °C timp de 20 de minute.

Mediu de extract de drojdie de săruri minerale (YGM)

Extract de drojdie difco bacto	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
Agar purificat difco bacto	18 g
Apă distilată	1 litru

Se sterilizează câte 0,5 l prin autoclavizare la 115 °C timp de 20 de minute.

Apendicele 7

TESTE NUTRIȚIONALE ȘI FIZIOLOGICE PENTRU IDENTIFICAREA C. SEPEDONICUM

Toate mediile trebuie să fie incubate la 21 °C și se examinează după 6 zile. Dacă creșterea nu a avut loc, se incubează până la maximum 20 de zile.

— **Testul oxidativ și fermentativ** (Hugh și Leifson, 1953) -- testul O/F.

Mediul de bază:

KCl	0,2 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	1,0 g
Peptonă difco bacto	1,0 g
Agar purificat difco bacto	3,0 g
D(+)-glucoză (monohidrat)	10,0 g
Albastru de bromotimol	0,03 g
Apă distilată	1 litru

Se amestecă și se ajustează la un pH de 7,0 până la 7,2 cu KOH 1 N.

Se distribuie în tuburi de cultură Pyrex de 16 mm x 100 mm (capacitate 12 ml) în volume de 5 ml și 10 ml.

Se sterilizează prin autoclavizare la 115 °C timp de 10 minute

Se inoculează prin tăiere tuburi de 5 ml și 10 ml din fiecare cultură. Se adaugă aseptice 1 până la 2 ml parafină lichidă sterilă la tubul de 10 ml. Se incubează.

Reacție pozitivă:

Tub	Culoare	Interpretare
Deschis	Galben	Fermentativă
Închis	Galben	
Deschis	Galben	Oxidativă
Închis	Verde-albastru	
Deschis	Verzui	Oxidativă sau inertă
Închis	Verde-albastru	

— **Testul oxidazei** (Kovacs, 1956)

Reactivul oxidazei Kovacs:

Soluție apoasă de dihidroclorură de tetrametil parafenilendiamină 1 % (BDH nr. 30386) în apă distilată.

Acest reactiv trebuie să fie preparat proaspăt în volume de 1 ml sau poate fi conservat într-o sticlă maronie la 5 °C timp de una până la patru săptămâni.

Se pune o picătură de reactiv pe un filtru de hârtie într-o cutie Petri curată. Se rade imediat o parte din cultura de testare de pe agarul nutritiv utilizând o buclă de platină.

Reacție pozitivă: apare o colorație purpurie în termen de 10 secunde. Culturile cu durate de 10 până la 30 de secunde sunt slab pozitive.

N.B.: Este esențial să se utilizeze o buclă de platină și culturi NA, deoarece urmele de fier sau conținutul ridicat de zahăr din mediul de creștere pot da rezultate fals pozitive.

— **Producția de acid din lactoză, ramnoză, salicin, glicerol**

Se prepară un mediu Hugh și Leifson O/F fără glucoză. Se distribuie în volume de 5 ml în tuburi. Se sterilizează prin autoclavizare la 115 °C timp de 10 minute. La baza topită la 45 °C se adaugă aseptice 0,5 ml de soluții apoase 10 % sterilizate prin filtrare de glicerol, lactoză, ramnoză sau salicin. Se amestecă cu grijă.

Reacție pozitivă: schimbarea culorii din verde-albastru în galben indică producerea acidului.

— **Testul catalazei**

Se depune o picătură de peroxid de hidrogen (30 de volume) pe o lamelă curată și se emulsionează cu o buclă de culturi folosind o buclă de platină.

Reacție pozitivă: producerea de bule de oxigen indică prezența catalazei.

— **Reductaza nitratului și denitrificarea** (Bradbury, 1970)

Mediu de cultură:

KNO ₃ (fără nitrit)	1 g
Extract de drojdie difco bacto	1 g
K ₂ HPO ₄	5 g
Apă distilată	1 litru

Se dozează în volume de 10 ml în sticle de 20 ml. Se sterilizează prin autoclavizare la 121 °C timp de 15 minute.

Reactiv A:

H ₂ SO ₄	8 g
Acid acetic 5 N	1 litru

Reactiv B:

Naftilamină	5 g
Acid acetic 5 N	1 litru

Se inoculează mediul de nitrat în duplicat. Se testează după 10 și 20 de zile, adăugând o picătură de iod Lugol, 0,5 ml de reactiv A și 0,5 ml de reactiv B. Dacă mediul nu devine roșiatic, se adaugă aproximativ 50 mg pudră de zinc. Se observă reacția culorii.

Reacția pozitivă:

Reacția culorii

	<i>Reacția culorii</i>	
	Etapa 1	Etapa 2
Nici o reducere de nitrat	incolor	roșu
Reducerea nitratului până la nitrit (numai reductaza nitratului)	roșu	-
Reducerea nitratului peste nitrit (denitrificare -- reductaza nitratului și nitritului)	incolor	incolor

— **Producția de urează** (Lelliott, 1966)

Mediu bazal:

Bază de uree oxoid agar (CM53)	2,4 g
Apă distilată	95 ml

Se sterilizează prin autoclavizare la 115 °C timp de 20 de minute. Se răcește baza topită la 50 °C și se adaugă aseptice 5 ml de soluție de uree apoasă 40 % sterilizată prin filtrare (oxid SR20). Se amestecă bine.

Se dozează în volume de 6 ml în tuburi sterile (16 x 100 mm) și se lasă să se depună în pantă.

Reacție pozitivă: Mediul galben-portocaliu capătă o colorație roșie vișinie sau roz fucsina, dacă s-a produs urează.

Utilizarea citratului (Christensen) (Skerman, 1967)

Bază de citrat agar (Merck 2503)	23 g
Apă distilată	1 litru

Se amestecă și se dizolvă prin încălzire. Se dozează în volume de 6 ml ca pentru mediul de uree. Se sterilizează prin autoclavizare la 121 °C timp de 15 minute și se lasă să se depună în pantă.

Reacție pozitivă: Utilizarea citratului este indicată printr-o reacție de schimbare a culorii mediului din portocaliu în roșu.

— **Producția de sulfură de hidrogen** (Ramamurthi, 1959)

Mediu:

Tripton difco bacto (nr. 0123)	10 g
K ₂ HPO ₄	1 g
NaCl	5 g
Apă distilată	1 litru

Se dizolvă și se dozează în volume de 6 ml în tuburi de 16 x 100 mm. Se sterilizează prin autoclavizare la 115 °C timp de 10 de minute.

Se inoculează și se suspendă aseptice o hârtie de acetat de plumb (Merck 9511) la gura tubului. Se fixează cu capacul. Se incubează timp de maximum douăzeci de zile.

Reacție pozitivă: Producerea H₂S din tripton este indicată prin colorarea în negru maroniu a hârtiei reactive.

— **Producția de indol** (Ramamurthi, 1959)

Mediu:

Ca și pentru testul H₂S.

Se îndepărtează hârtia de acetat de plumb și se adaugă 1 până la 2 ml de eter etilic și se agită ușor. Se lasă straturile să se separe (5 min). Se adaugă cu grijă 0,5 ml de reactiv Kovacs (Merck 9293) în tubul înclinat.

Reacție pozitivă: prezența indolului este indicată prin apariția unei culori roșii în stratul galben dintre eter și fracțiunile apoase.

— **Creștere la 37 °C** (Ramamurthi, 1959)

Mediu:

Amestec nutritiv difco bacto	8 g
Apă distilată	1 litru

Se amestecă, se dizolvă și se dozează în volume de 6 ml în tuburi.

Se sterilizează prin autoclavizare la 121 °C timp de 15 minute.

Se inoculează și se incubează la 37 °C.

Reacție pozitivă: se urmărește creșterea.

— **Creșterea în clorură de sodiu 7 %** (Ramamurthi, 1959)

Mediu:

Amestec nutritiv difco bacto	8 g
NaCl	70 g
Apă distilată	1 litru

Se amestecă, se dizolvă și se dozează în volume de 6 ml în tuburi.

Se sterilizează prin autoclavizare la 112 °C timp de 15 minute.

Reacție pozitivă: se urmărește creșterea.

— **Hidroliza gelatinei** (Lelliot, Billing și Hayward, 1966)

Mediu:

Gelatină difco bacto (nr. 0143)	120 g
Apă distilată	1 litru

Se amestecă, se dizolvă prin încălzire și se dozează în volume de 6 ml în tuburi.

Se sterilizează prin autoclavizare la 121 °C timp de 15 minute.

Reacție pozitivă: lichefierea gelatinei, chiar dacă este ținută la 5 °C timp de 30 de minute.

— **Hidroliza amidonului**

Mediu:

Agar nutritiv difco bacto (topit)	1 litru
Amidon solubil difco bacto (nr. 0178)	2 g

Se amestecă și se sterilizează prin autoclavizare la 115 °C timp de 10 de minute.

Se toarnă în talere. Se inoculează în spoturi talerele.

Dacă se constată o creștere bună (10 până la 20 de zile), se îndepărtează o parte din creștere și se imersează în iod Lugol.

Reacție pozitivă: hidroliza amidonului este indicată prin zone limpezi, sub sau în jurul creșterii bacteriene; restul mediului se colorează în purpuriu.

— **Hidrolaza esculinei** (Sneath și Collins, 1974)

Mediu:

Peptonă difco bacto	10 g
Esculină	1 g
Citrat feric (Merck 3862)	0,05 g
Citrat de sodiu	1 g
Apă distilată	1 litru

Se amestecă în vederea dizolvării și se dozează în volume de 6 ml în tuburi. Se sterilizează prin autoclavizare la 115 °C timp de 10 de minute.

Mediul este limpede, dar are o fluorescență albăstrui.

Reacție pozitivă: hidroliza esculinei este indicată prin apariția unei culori maro împreună cu dispariția fluorescenței. Aceasta poate fi controlată utilizând o lampă cu raze ultraviolete.

BIBLIOGRAFIE

- Bradbury, J. F., 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants (Izolarea și studiul preliminar al bacteriilor plantelor), *Rev. Pl. Path.*, 49, 213-218.
- Dinesen, I. G., 1984. The extraction and diagnosis of *Corynebacterium sepedonicum* from diseased potato tubers (Extragerea și diagnosticarea lui *Corynebacterium sepedonicum* la tuberculii de cartofi bolnavi), *EPPO Bull.*, 14 (2), 147-152.
- Doetsch, R. N., 1981. Determinative methods of light microscopy. In: Manual of methods for general bacteriology (Metode determinative de microscopie ușoară. În: Manualul metodelor de bacteriologie generală, Societatea americană de microbiologie), American Society for Microbiology, Washington, 21-23.
- Hugh, R., and Leifson, F., 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria (Semnificația taxonomică a metabolismului fermentativ față de cel oxidativ al carbohidraților prin diverse bacterii gram-negative), *J. Bact.*, 66, 24-26.
- Janse, J. D., and Van Vaerenbergh, J., The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (*Corynebacterium sepedonicum*) in potato [Interpretarea metodei CE privind detectarea infecțiilor latente cu veștejirea bacteriană la cartof (*Corynebacterium sepedonicum*)]. *EPPO Bull.*, 17, 1987, pp. 1-10.
- Kovacs, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxydase reaction (Identificarea *Pseudomonas pyocyanea* prin reacția de oxidază), *Nature, Lond.*, 178, 703.
- Lelliott, R. A., 1966. The plant pathogenic coryneform bacteria (Bacteriile corineforme patogene la plante), *J. appl. Bact.*, 29, 114-118.
- Lelliott, R. A., Billing, E., and Hayward, A. C., 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads (Un protocol determinativ pentru pseudomonadele patogene fluorescente ale plantelor), *J. appl. Bact.*, 29, 470-489.
- Lelliott, R. A. and Sellar, P.W., 1976. The detection of latent ring rot (*Corynebacterium sepedonicum* (Spiek. et Koth.) Skapt. et Burkh.) in potato stocks [Detectarea veștejirii bacteriene latente (*Corynebacterium sepedonicum*) la stocurile de cartofi], *EPPO Bull.*, 6 (2), 101-106.
- Ramamurthi, C. S., 1959. Comparative studies on some Gram-positive phytopathogenic bacteria and their relationship to the Corynebacteria (Studii comparative privind anumite bacterii fitopatogene gram-pozitive și relația lor cu bacteriile corineforme), *Mem. Cornell agric. Exp. Sta.*, 366, 52 pp.
- Sherman, V. B. D., 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria (Un ghid pentru identificarea speciilor de bacterii), Ediția a doua, William and Wilkins Company, Baltimore.
- Sneath, P. H. A. and Collins, V.G., 1974. A study in test reproductibility between laboratories: report of *Pseudomonas* working party (Un studiu al reproductibilității între laboratoare: raportul grupurilor de lucru *Pseudomonas*), *Antonie van Leeuwenhoek*, 40, 481-527.

ANEXA II

1. Pentru fiecare apariție suspectată pentru care s-a identificat un test pozitiv de imunofluorescență, conform metodei descrise în anexa I, și pentru care se anticipează confirmarea sau infirmarea prin aplicarea completă a metodei menționate, trebuie să se păstreze și să se conserve adecvat:
 - toții tuberculii sau plantele eșantionate ori de câte ori este posibil și
 - toate extractele rămase și lamelele de imunofluorescență pregătite suplimentar, până la aplicarea cu succes a metodei menționate.
 2. În cazul confirmării pozitive a organismului, trebuie să se păstreze și să se conserve adecvat:
 - materialul specificat la alineatul (1), și
 - o mostră din materialul de vânăță infectată, inoculată cu un tubercul sau extract de plantă și
 - cultura izolată a organismului,timp de minimum o lună de la procedura de notificare conformă cu articolul 5 alineatul (2).
-

ANEXA III

1. Elementele avute în vedere pentru determinarea gradului de contaminare probabilă conform articolului 5 alineatul (1) litera (b) includ:
 - tuberculii sau plantele crescute în locul de producție desemnat ca fiind contaminat conform articolului 5 alineatul (1) litera (a);
 - locul/locurile de producție sau localurile având o anumită legătură cu producerea tubercuilor sau plantelor desemnate ca fiind contaminate conform articolului 5 alineatul (1) litera (a), inclusiv acelea care utilizează echipamente și utilaje de producție în mod direct sau printr-un contractor comun;
 - tuberculii sau plantele produse în locul/locurile de producție menționate la liniuța anterioară sau prezente în asemenea loc/locuri de producție, în perioada în care tuberculii sau plantele desemnate ca fiind contaminate conform articolului 5 alineatul (1) litera (a) au fost prezente în localurile sau locurile de producție menționate la prima liniuță;
 - depozitele centrale unde se manipulează cartofii proveniți din locurile de producție menționate;
 - toate utilajele, vehiculele, containerele, depozitele sau părți din acestea și oricare alte obiecte, inclusiv materialul de ambalare ce ar fi putut intra în contact cu tuberculii sau plantele desemnate ca fiind contaminate conform articolului 5 alineatul (1) litera (a) în timpul ultimelor 12 luni sau ori de câte ori este necesar,
 - toți tuberculii sau plantele depozitate în sau în contact cu oricare dintre structurile sau obiectele enumerate la liniuța anterioară, înainte de curățarea și dezinfectarea unor astfel de structuri și obiecte și
 - ca rezultat al testării conform articolului 6, tuberculi sau plante cu aceeași origine clonală cu ale desemnate ca fiind contaminate conform articolului 5 alineatul (1) litera (a) și pentru care investigațiile indică o contaminare probabilă.
2. Elementele care trebuie avute în vedere în determinarea unei posibile răspândiri conform articolului 5 alineatul (1) litera (c) includ:
 - proximitatea altor locuri de producție în care se cresc cartofi sau alte plante gazdă,
 - depozitarea în comun a stocurilor de cartofi de sămânță.
3. Detaliile notificării la care se referă primul paragraf din articolul 5 alineatul (2) includ:
 - pentru toate transporturile de cartofi sau lotul desemnat ca fiind contaminat, certificatele stipulate la articolele 7 sau 8 din Directiva 77/93/CEE, pașaportul sau numărul de înregistrare, după cum este cazul;
 - denumirea soiului pentru stocurile de cartofi de sămânță, și, dacă este posibil, în toate celelalte cazuri;
 - descrierea elementelor de contaminare desemnate și demarcarea zonelor;
 - disponibilitatea extractului, a lamelelor imunofluorescente pregătite, a materialului de vânăta infectată și a unei culturi izolate a organismului din testul în care s-a făcut confirmarea pozitivă a organismului.

ANEXA IV

1. Măsurile monitorizate oficial menționate la articolul 7 alineatul (1) privind eliminarea tuberculilor sau plantelor desemnate ca fiind contaminate conform articolului 5 alineatul (1) litera (a) sunt următoarele:
 - utilizarea prelucrării industriale prin livrarea directă și imediată către o uzină prelucrătoare, dotată cu facilități adecvate de eliminare a deșeurilor, pentru care s-a stabilit că nu există un risc identificabil de răspândire a organismului și cu un sistem de dezinfectare a zonelor de depozitare și a vehiculelor de transport sau
 - alte măsuri, cu condiția stabilirii inexistenței unui risc identificabil de răspândire a organismului; aceste măsuri se notifică Comisiei și celorlalte state membre.
2. Măsurile de utilizare adecvată sau de eliminare a tuberculilor sau plantelor stabilite ca fiind probabil contaminate conform articolului 5 alineatul (1) litera (b) și menționate la articolul 7 alineatul (2), sub controlul instituțiilor oficiale responsabile ale statelor membre, sunt următoarele:
 - utilizarea pe post de cartofi destinați consumului, gata ambalați pentru livrare directă și utilizare fără reîmpachetare și destinați pentru o astfel de livrare și utilizare directă sau
 - utilizarea pe post de cartofi destinați prelucrării industriale și livrării directe și imediate către o uzină prelucrătoare dotată cu facilități adecvate de eliminare a deșeurilor și dezinfecție sau
 - alte utilizări sau eliminări cu condiția stabilirii inexistenței unui risc identificabil de răspândire a organismului.
3. Metodele adecvate pentru curățare și dezinfectare a obiectelor menționate la articolul 7 alineatul (3) sunt cele pentru care s-a stabilit că nu există un risc identificabil de răspândire a organismului și care sunt utilizate sub supravegherea instituțiilor oficiale responsabile ale statelor membre.
4. Seriile de măsuri care trebuie puse în aplicare de către statele membre în zonele demarcate stabilite conform articolului 5 alineatul (1) litera (c) și menționate la articolul 7 alineatul (4) includ:
 - 4.1. în locurile de producție desemnate ca fiind contaminate conform articolului 5 alineatul (1) litera (a):
 - (a) pe un teren desemnat ca fiind contaminat conform articolului 5 alineatul (1) litera (a):
 - (i) — pe durata a minimum trei ani de creștere, care urmează anului contaminării desemnate,
 - se iau măsuri de eliminare a plantelor de cartof spontane și a altor plante naturale gazdă a organismului și
 - nu se plantează tuberculi, plante sau semințe omologate sau alte plante naturale gazdă a organismului sau vegetale pentru care s-a identificat un risc de supraviețuire sau răspândire a organismului până când se constată că terenul nu mai are plante de cartof spontane timp de minimum doi ani de creștere consecutivi;
 - în primul sezon de recoltare a cartofilor, care urmează după perioada specificată la liniuța precedentă, se plantează cartofii de sămânță omologați oficial pentru producția cartofilor de depozitare și se efectuează o anchetă oficială, conform măsurilor prevăzute la articolul 2 alineatul (1);
 - în sezonul de recoltare a cartofilor care urmează celui menționat la liniuța anterioară și după respectarea unui ciclu de asolament adecvat, se plantează cartofi de sămânță omologați oficial, fie în scop de însămânțare, fie pentru depozitare, și se efectuează o anchetă oficială conform articolului 2 alineatul (1) sau
 - (ii) — pe durata a minimum patru ani de creștere, care urmează anului contaminării desemnate,
 - se iau măsuri de eliminare a plantelor de cartof spontane și a altor plante naturale gazdă a organismului și
 - terenul este lăsat necultivat ca părloagă sau ca pășune permanentă, cosită scurt sau cu pășunat intens,
 - în primul sezon de recoltare a cartofilor, care urmează perioadei specificate la liniuța precedentă, se plantează cartofii de sămânță omologați oficial, fie în scop de însămânțare, fie pentru depozitare, și se efectuează o anchetă oficială, conform măsurilor prevăzute la articolul 2 alineatul (1);

- (b) pe alte terenuri:
- în timpul anului de creștere care urmează anului contaminării desemnate:
 - fie nu se plantează tuberculi, plante, semințe omologate sau alte plante naturale gazdă a organismului și se iau măsuri de eliminare a plantelor de cartof spontane, dacă este necesar,
 - fie se plantează numai cartofi de sămânță omologați oficial, cu condiția ca instituțiile oficiale responsabile să aibă garanția că s-a îndepărtat riscul plantelor de cartofi spontane și al altor plante gazdă naturale;
 - pe durata a minimum doi ani de creștere care urmează anului specificat la liniuța precedentă, se plantează numai cartofi de sămânță omologați oficial, în scopul însămânțării sau pentru depozitare;
 - în fiecare dintre anii de creștere menționați la liniuța precedentă, se iau măsuri de eliminare a plantelor spontane și a celor naturale gazdă a organismului și se efectuează o anchetă oficială conform articolului 2 alineatul (1);
 - dacă se plantează cartofi de sămânță omologați oficial pentru depozitare în anul de creștere următor contaminării desemnate, recolta se inspectează la intervale adecvate și plantele de cartof spontane sunt supuse testului de depistare a organismului;
- (c) imediat după desemnarea contaminării conform articolului 5 alineatul (1) litera (a) și în fiecare dintre anii de creștere ulterioari până la și inclusiv primul sezon permis de recoltare a cartofilor de pe terenul/terenurile desemnate ca fiind contaminate, conform măsurilor prevăzute la litera (a), toate echipamentele și facilitățile de depozitare de la locul de producție și cele aferente producției de cartofi se curăță și se dezinfectează după cum este necesar și prin utilizarea unor metode adecvate conform punctului (3);
- (d) la acele sisteme de producție unde este posibilă înlocuirea completă a mediului de creștere,
- nu se plantează tuberculi, plante sau semințe omologate decât cu condiția ca unitatea de producție să fie supusă măsurilor de monitorizare oficială de eliminare a organismului și se elimină toți cartofii sau alte materiale solanacee, inclusiv minimum o schimbare completă a mediului de creștere și a modului de curățare și dezinfectare a unității de producție și a tuturor echipamentelor și în temeiul obținerii aprobării ulterioare de producție a cartofilor din partea instituțiilor oficiale responsabile și
 - producția de cartofi se realizează din cartofi de sămânță omologați oficial sau din mini-tuberculi sau micro-plante obținute din surse testate;

4.2. în cadrul zonei demarcate și fără a se aduce atingere măsurilor prevăzute la punctul 4.1, statele membre:

- (a) imediat și pentru minimum trei sezoane de creștere după contaminarea desemnată:
- asigură supravegherea de către instituțiile oficiale responsabile a localurilor de creștere, depozitare sau manipulare a tuberculilor de cartofi, împreună cu localurile unde funcționează utilaje destinate producției de cartofi potrivit unor condiții contractuale;
 - impun curățarea și dezinfectarea echipamentelor și a depozitelor acestor localuri, dacă este necesar și prin utilizarea unor metode adecvate conform punctului 3;
 - necesită plantarea exclusiv a semințelor autorizate, pentru toate recoltele de cartofi din zona respectivă
 - impun manipularea separată a stocurilor de sămânță recoltate față de cele destinate depozitării în toate localurile din zona respectivă;
 - efectuează o anchetă oficială conform măsurilor prevăzute la articolul 2 alineatul (1);
- (b) stabilesc, dacă este necesar, un program de înlocuire a tuturor stocurilor de cartofi de sămânță într-o perioadă de timp adecvată.

Măsurile puse în aplicare conform punctului 4.2, împreună cu numele de înregistrare a producătorilor, depozitele colective și centrele de distribuție din cadrul zonei demarcate se notifică anual celorlalte state membre și Comisiei.