Este documento constitui um instrumento de documentação e não vincula as instituições

►**B**

DIRECTIVA 93/85/CEE DO CONSELHO

de 4 de Outubro de 1993

relativa à luta contra a podridão anelar da batata

(JO L 259 de 18.10.1993, p. 1)

Alterada por:

		Jornal Oficial		
		n.º	página	data
►**M1**	Directiva 2006/56/CE da Comissão de 12 de Junho de 2006	L 182	1	4.7.2006

▼B

DIRECTIVA 93/85/CEE DO CONSELHO

de 4 de Outubro de 1993

relativa à luta contra a podridão anelar da batata

O CONSELHO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Económica Europeia e, nomeadamente, o seu artigo 43.º,

Tendo em conta a proposta da Comissão ([1]),

Tendo em conta o parecer do Parlamento Europeu ([2]),

Tendo em conta o parecer do Comité Económico e Social ([3]),

Considerando que a produção da batata ocupa uma posição importante na agricultura da Comunidade; que o rendimento desta produção está constantemente ameaçado por organismos prejudiciais;

Considerando que a protecção da cultura da batata contra os organismos prejudiciais permite não só manter a capacidade produtiva, como igualmente aumentar a produtividade agrícola;

Considerando que as medidas de protecção destinadas a evitar a introdução de organismos prejudiciais no território de um Estado-membro terão apenas um efeito limitado caso esses organismos não sejam combatidos simultânea e metodicamente em toda a Comunidade e não seja evitada a sua propagação;

Considerando que um dos organismos prejudiciais à batateira é o Clavibacter michiganensis (Smith) Davis et al. ssp. sepedonicus (Spieckermann e Kotthoff) Davis et al., o agente patogénico da doença da podridão anelar da batata; que esta doença surgiu em algumas regiões da Comunidade e que ainda existem certos focos de infecção limitados;

Considerando que existe um risco considerável para a cultura da batata na Comunidade se não forem adoptadas medidas eficazes para localizar esta doença e determinar a sua distribuição, evitar o seu aparecimento e propagação e, quando a doença seja detectada, evitar a sua propagação e combatê-la tendo em vista a sua erradicação;

Considerando que, para atingir este objectivo, devem ser adoptadas determinadas medidas no âmbito da Comunidade; que, além disso, os Estados-membros devem poder tomar medidas adicionais ou mais rigorosas, quando necessário e desde que não sejam criados obstáculos à circulação da batata na Comunidade, sem prejuízo do disposto na Directiva 77/93/CEE do Conselho, de 21 de Dezembro de 1976, relativa às medidas de protecção contra a introdução nos Estados-membros de organismos prejudiciais às plantas e produtos vegetais ([4]); que essas medidas devem ser notificadas aos demais Estados-membros e à Comissão;

Considerando que a Directiva 80/665/CEE do Conselho, de 24 de Junho de 1980, relativa à luta contra a murchidão bacteriana da batateira ([5]), define medidas mínimas a adoptar pêlos Estados-membros contra a podridão anelar;

Considerando que, desde então, se registaram progressos significativos no conhecimento da podridão anelar da batata e na detecção do agente patogénico dessa doença;

Considerando que a aplicação do regime fitossanitário comunitário à Comunidade enquanto espaço sem fronteiras internas exigirá o reexame e a revisão de algumas das disposições da Directiva 80/665/CEE;

([1]) JO nº C 93 de 2. 4. 1993, p. 12.
([2]) JO nº C 176 de 28. 6. 1993, p. 210.
([3]) JO nº C 161 de 14. 6. 1993, p. 18.
([4]) JO nº L 26 de 31. 1. 1977, p. 20. Directiva com a última redacção que lhe foi dada pela Directiva 92/l03/CEE da Comissão (JO nº L 363 de 11. 12. 1992, p. 1).
([5]) JO nº L 180 de 14. 7. 1980, p. 30.

▼B

Considerando que, na sequência desta análise, o disposto na Directiva 80/665/CEE foi julgado insuficiente, sendo necessário estabelecer medidas mais pormenorizadas;

Considerando que, neste contexto, se deve proceder à revogação da Directiva 80/665/CEE e à adopção das medidas necessárias;

Considerando que as medidas devem ter em conta, em primeiro lugar, que a doença pode permanecer latente e não ser detectada na cultura e nos tubérculos armazenados, sendo unicamente possível uma prevenção eficaz através da produção e utilização de batata de semente indemne de infecção e, em segundo lugar, que são necessárias prospecções oficiais sistemáticas a fim de proceder à sua localização; que a propagação do agente patogénico na batateira em crescimento não é o factor mais importante, mas que o agente patogénico pode persistir durante o Inverno nas plantas provenientes de tubérculos deixados no terreno (plantas espontâneas) e que estas constituem as principais causas da transmissão da infecção de uma campanha para a outra; que o agente patogénico é propagado, sobretudo, através da contaminação de batatas em contacto com batatas infectadas e com equipamento de plantação, arranque e manuseamento ou em recipientes de transporte e de armazenagem contaminados com o organismo devido a contactos anteriores com batatas infectadas; que esses objectos contaminados podem-se manter infecciosos durante algum tempo após contaminação; que a propagação do agente patogénico pode ser reduzida ou evitada através da desinfecção desses objectos; que a contaminação de batata de semente constitui um risco importante para a propagação do agente patogénico;

Considerando que, para a determinação dos pormenores das medidas gerais, bem como relativamente às medidas mais rigorosas ou adicionais adoptadas pêlos Esta-dos-membros tendo em vista evitar a introdução do agente patogénico no seu território, é desejável que os Esta-dos--membros cooperem estreitamente com a Comissão no âmbito do Comité fitossanitário permanente, a seguir designado «comité»,

ADOPTOU A PRESENTE DIRECTIVA:

Artigo 1.º

A presente directiva diz respeito às medidas a adoptar pêlos Estados--membros contra o Clavibacter michiganensis (Smith) Davis et al. ssp. sepedonicus (Spieckermann e Kotthoff) Davis et al., o agente patogénico da podridão anelar da batata (a seguir designado «o organismo»), a fim de:

a) O localizar e determinar a sua distribuição;

b) Evitar o seu aparecimento e propagação;

c) Quando detectado, evitar a sua propagação e combatê-lo com vista à sua erradicação.

Artigo 2.º

1. Os Estados-membros procederão sistematicamente a prospecções oficiais do organismo em tubérculos e, sempre que apropriado, em plantas de batata (Solanum tuberosum L.), originárias do seu território, com vista à confirmação da ausência do organismo.

Para efeitos destas prospecções, quando se tratar de tubérculos, serão colhidas amostras tanto de batatas de semente, como de outras batatas, de preferência provenientes de lotes em armazém, que serão submetidas a testes laboratoriais oficiais, ou realizados sob controlo oficial, utilizando o método referido no anexo I, para a detecção e diagnóstico do organismo. Além disso, quando adequado, poderá ser efectuada uma inspecção visual oficial, ou oficialmente controlada, através do corte de tubérculos noutras amostras.

Quando se tratar de plantas, estas prospecções serão efectuadas segundo métodos adequados e as amostras serão submetidas a testes adequados oficiais ou oficialmente controlados.

▼B

O número, origem, estratificação e calendário da colheita de amostras serão decididos pêlos organismos oficiais responsáveis, na acepção da Directiva 77/93/CEE, com base em princípios científicos e estatísticos válidos e na biologia do organismo, e atendendo aos sistemas de produção de batata específicos dos Estados-membros em questão. Os pormenores respectivos serão apresentados anualmente aos demais Estados-membros e à Comissão, com vista a garantir níveis comparáveis de segurança entre os Estados-membros na confirmação da ausência do organismo.

2. Os resultados das pesquisas oficiais previstas no nº 1 serão notificados, pelo menos uma vez por ano, aos demais Estados-membros e à Comissão. Os detalhes desta notificação são confidenciais. Podem ser apresentados ao comité de acordo com o procedimento previsto no artigo 16º A da Directiva 77/93/CEE.

3. De acordo com o procedimento previsto no artigo 16.ºA da Directiva 77/93/CEE, podem ser adoptadas as seguintes disposições:

— as regras relativas às prospecções previstas no nº l, a realizar de acordo com princípios científicos e estatísticos válidos,

— as regras relativas à notificação prevista no nº 2.

4. De acordo com o procedimento previsto no artigo 16.ºA da Directiva 77/93/CEE, serão adoptadas as seguintes disposições:

— o método adequado para as prospecções e para os testes previstos no terceiro parágrafo do nº l do presente artigo.

Artigo 3.º

Os Estados-membros assegurarão que seja comunicada aos respectivos organismos oficiais responsáveis a ocorrência suspeita ou a presença confirmada do organismo prejudicial em plantas de batateira e tubérculos ou em tubérculos colhidos, armazenados ou comercializados no seu território.

Artigo 4.º

1. Em caso de ocorrência suspeita, os organismos oficiais responsáveis do Estado-membro em que foram registados estes casos devem assegurar a realização de testes laboratoriais oficiais, ou oficialmente controlados, utilizando o método previsto no anexo I e de acordo com as condições definidas no ponto l do anexo II, a fim de confirmar ou refutar a ocorrência suspeita. No primeiro caso, é aplicável o disposto no ponto 2 do anexo II.

2. Consoante a confirmação ou a refutação da ocorrência suspeita nos termos do nº l, quando a confirmação tiver sido identificada por meio de:

i) Observação de sintomas visuais de diagnóstico suspeito da doença, ou

ii) Realização de um teste positivo de imunofluorescência tal como consta do anexo I, ou outro teste positivo apropriado,

os organismos oficiais do Estado-membro deverão:

a) Proibir a circulação de todos os lotes ou remessas dos quais tenham sido colhidas amostras, excepto sob o seu controlo e desde que se tenha concluído que não existe qualquer risco identificável de propagação do organismo;

b) Adoptar medidas para determinar a origem da ocorrência suspeita;

c) Adoptar medidas preventivas adicionais adequadas, com base no nível previsível de risco, a fim de evitar a propagação do organismo. Estas medidas podem incluir o controlo oficial da circulação de todos os outros tubérculos ou plantas dentro ou fora de instalações associadas à ocorrência suspeita.

3. De acordo com o procedimento previsto no artigo 16.ºA da Directiva 77/93/CEE, podem ser adoptadas as seguintes disposições:

— as medidas referidas na alínea c) do nº 2 do presente artigo.

▼B

4. De acordo com o procedimento previsto no artigo 16.ºA da Directiva 77/93/CEE, serão adoptadas as seguintes disposições:

— os outros testes adequados previstos na subalínea ii) do nº 2 do presente artigo.

Artigo 5.º

1. Se os testes de laboratório oficiais, ou oficialmente controlados, utilizando o método previsto no anexo I, confirmarem a presença do organismo numa amostra de tubérculos, plantas ou partes de plantas, os organismos oficiais responsáveis de um Estado-membro, com base em princípios científicos válidos, na biologia do organismo e nos sistemas de produção, comercialização e transformação específicos desse Estado-membro:

a) Declararão contaminados os tubérculos ou plantas, as remessas e/ou os lotes, a maquinaria, os veículos, os navios, os armazéns ou respectivas partes e quaisquer outros objectos, incluindo material de embalagem, em que tiver sido colhida a amostra e, quando adequado, o local ou locais de produção e o(s) campo(s) onde tiverem sido colhidos os tubérculos ou plantas;

b) Determinarão, tendo em conta o disposto no ponto l do anexo III, a extensão da contaminação provável por contacto pré ou pós-colheita ou por relação de produção com a contaminação declarada;

c) Demarcarão uma zona com base na declaração de contaminação nos termos da alínea a), na determinação da extensão da contaminação provável nos termos da alínea b) e na possível propagação do organismo, tendo em conta o disposto no ponto 2 do anexo III.

2. Nos termos do disposto no ponto 3 do anexo III, os Estados-membros notificarão imediatamente os demais Estados-membros e a Comissão de qualquer contaminação declarada nos termos da alínea a) do nº l e dos pormenores respeitantes à demarcação da zona nos termos da alínea c) do nº 1.

Os detalhes desta notificação são confidenciais. Podem ser apresentados ao comité de acordo com o procedimento previsto no artigo 16.ºA da Directiva 77/93/CEE.

3. Na sequência da notificação nos termos do nº 2 e dos elementos dela constantes, os demais Estados-membros mencionados na notificação, quando adequado, declararão a contaminação, determinarão a extensão da contaminação provável e demarcarão uma zona, nos termos das alíneas a), b) e c) do nº l, respectivamente.

Artigo 6.º

Se os tubérculos ou plantas tiverem sido declarados contaminados nos termos do nº l, alínea a), do artigo 5.º, os Estados-membros determinarão a realização de testes de acordo com o nº 1 do artigo 4º nas existências de batata com uma relação clonal com a batata contaminada. Os testes serão realizados no número de tubérculos ou plantas necessário para determinar a provável fonte primária de infecção e a extensão da contaminação provável, de preferência por ordem do grau de risco.

Na sequência dos testes, proceder-se-á, quando adequado, a outras declarações de contaminação, à determinação da extensão da contaminação provável e à demarcação de uma zona, nos termos do nº l, alíneas a), b) e c), do artigo 5.º, respectivamente.

Artigo 7.º

1. Os Estados-membros determinarão que os tubérculos ou plantas declarados contaminados nos termos do nº l, alínea a), do artigo 5º não possam ser plantados e que, sob controlo dos respectivos organismos oficiais responsáveis, sejam:

— destruídos, ou

▼B

— eliminados de outro modo, de acordo com medidas oficialmente controladas, nos termos do ponto l do anexo IV, desde que se tenha concluído não existir qualquer risco identificável de propagação do organismo.

2. Os Estados-membros determinarão que os tubérculos ou plantas considerados provavelmente contaminados nos termos do nº l, alínea b), do artigo 5º não possam ser plantados e que, sem prejuízo dos resultados dos testes referidos no artigo 6º para as existências com relação clonal, sejam, sob controlo dos respectivos organismos oficiais responsáveis, alvo de utilização ou eliminação adequados, como especificado no ponto 2 do anexo IV, em condições que garantam a inexistência de qualquer risco identificável de propagação do organismo.

3. Os Estados-membros determinarão que toda a maquinaria, os veículos, os navios, os armazéns ou respectivas partes e quaisquer outros objectos, incluindo o material de embalagem, declarados contaminados nos termos do nº 1, alínea a), do artigo 5º ou considerados provavelmente contaminados nos termos do nº l, alínea b), do artigo 5.º, sejam destruídos ou limpos e desinfectados segundo métodos adequados, como especificado no ponto 3 do anexo IV. Após a desinfecção, esses objectos deixarão de ser considerados contaminados.

4. Sem prejuízo das medidas aplicadas nos termos dos n.ºs l, 2 e 3 do presente artigo, os Estados-membros determinarão que, na zona demarcada nos termos do nº 1, alínea c), do artigo 5.º, seja aplicada uma série de medidas, como especificado no ponto 4 do anexo IV.

Artigo 8.º

1. Os Estados-membros determinarão que a batata de semente satisfaça os requisitos da Directiva 77/93/CEE e seja proveniente, em linha directa, de material obtido no âmbito de um programa oficialmente aprovado, que tenha sido declarado indemne do organismo em testes oficiais, ou controlados oficialmente, utilizando o método constante do anexo I.

Aqueles testes devem ser realizados:

— quando a contaminação afectar a produção de batata de semente, nas plantas da selecção clonal inicial,

— nos restantes casos, tanto nas plantas da selecção clonal inicial como em amostras representativas de batata de semente de base ou de material de multiplicação anterior.

2. De acordo com o procedimento previsto no artigo 16.ºA da Directiva 77/93/CEE, podem ser adoptadas as seguintes disposições:

— as modalidades de aplicação do disposto no segundo parágrafo, primeiro travessão, do nº l,

— as normas relativas às amostras representativas previstas no segundo parágrafo, segundo travessão, do nº 1.

Artigo 9.º

Os Estados-membros proibirão a posse e o manuseamento do organismo.

Artigo 10.º

Sem prejuízo do disposto na Directiva 77/93/CEE, os Estados-membros podem autorizar derrogações às medidas referidas nos artigos 6.º, 7º e 9º da presente directiva para fins experimentais ou científicos e para trabalho de selecção varietal, desde que estas derrogações não prejudiquem as medidas de luta contra o organismo nem provoquem qualquer risco de propagação deste.

Artigo 11.º

Os Estados-membros podem adoptar medidas adicionais ou mais rigorosas, a fim de combater o organismo ou evitar a sua propagação, desde que sejam compatíveis com as disposições da Directiva 77/93/CEE.

▼B

As medidas adicionais a que se refere o parágrafo anterior podem incluir a prescrição de que as batatas de semente apenas sejam plantadas quando tenham sido oficialmente certificadas ou oficialmente inspeccionadas e obedeçam às normas fitossanitárias exigidas. Em especial, estas normas podem ser aplicáveis quando os agricultores tenham sido autorizados a utilizar, na sua própria exploração, batata de semente obtida a partir da colheita própria e em outros casos em que sejam plantadas batatas de semente de produção própria.

O teor dessas medidas será notificado aos demais Esta-dos-membros e à Comissão.

Artigo 12.º

À luz da evolução dos conhecimentos científicos e técnicos, podem ser adoptadas alterações aos anexos da presente directiva, de acordo com o procedimento previsto no artigo 16.ºA da Directiva 77/93/CEE.

Artigo 13?

1. Os Estados-membros adoptarão e publicarão, o mais tardar, até 15 de Novembro de 1993, as disposições necessárias para dar cumprimento à presente directiva. Do facto informarão imediatamente a Comissão.

Sempre que os Estados-membros adoptarem tais disposições, estas deverão incluir uma referência à presente directiva ou ser acompanhadas dessa referência aquando da sua publicação oficial. As regras relativas a esta referência serão adoptadas pêlos Estados-membros.

Os Estados-membros aplicarão estas disposições a partir de 16 de Novembro de 1993.

2. Os Estados-membros comunicarão imediatamente à Comissão todas as disposições de direito interno que adoptarem no domínio abrangido pela presente directiva. A Comissão informará do facto os demais Estados-membros.

Artigo 14.º

A Directiva 80/665/CEE é revogada a partir de 16 de Novembro de 1993.

Artigo 15.º

Os Estados-membros são os destinatários da presente directiva.

▼M1

ANEXO I

ESQUEMA DE ENSAIO PARA DIAGNÓSTICO, DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA BACTÉRIA RESPONSÁVEL PELA PODRIDÃO ANELAR DA BATATEIRA, *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* **(Smith) Davis** *et al.* **subsp.** *SEPEDONICUS* **(Spieckermann e Kotthoff) Davis** *et al.*

ÂMBITO DO ESQUEMA DE ENSAIO

O esquema de ensaio apresentado descreve os vários procedimentos envolvidos:

i) No diagnóstico da podridão anelar em tubérculos e plantas de batateira;

ii) Na detecção de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* em amostras de tubérculos e plantas de batateira;

iii) Na identificação de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus (C. m.* subsp. *sepedonicus*).

PRINCÍPIOS GERAIS

Nos apêndices são apresentados os protocolos optimizados para os diversos métodos, reagentes validados e pormenores relativos à preparação dos materiais para realização dos testes e para os controlos. O apêndice 1 apresenta uma lista dos laboratórios que foram incluídos na optimização e validação dos protocolos.

Visto que os protocolos envolvem a detecção de um organismo de quarentena e incluirão a utilização de culturas viáveis de *C. m.* subsp. *sepedonicus* como materiais de controlo, será necessário executar os procedimentos sob condições de quarentena adequadas, em instalações com sistemas apropriados de eliminação de resíduos e possuindo as licenças adequadas emitidas pelas autoridades oficiais competentes em matéria de quarentena fitossanitária.

Os parâmetros dos ensaios devem assegurar níveis de detecção de *C. m.* subsp. *sepedonicus* consistentes e reprodutíveis nos limiares definidos para os métodos seleccionados.

É primordial a preparação rigorosa dos controlos positivos.

A realização dos ensaios de acordo com os limiares exigidos implica também uma correcta regulação, manutenção e calibração do equipamento, manuseamento e preservação cuidadosos dos reagentes e estabelecimento de todas as medidas destinadas a evitar a contaminação entre amostras, por exemplo, a separação dos controlos positivos das amostras a testar. Devem ser aplicadas normas de controlo de qualidade no sentido de evitar erros administrativos e outros, em especial relativamente à rotulagem e documentação.

Uma ocorrência suspeita, tal como referido no n.º 2 do artigo 4.º da Directiva 93/85/CEE, implica um resultado positivo nos testes de diagnóstico ou de rastreio numa amostra, tal como especificado nos fluxogramas.

Caso o primeiro teste de rastreio (IF ou PCR/FISH) seja positivo, suspeita-se, então, de contaminação por Cms e deve efectuar-se um segundo teste de rastreio. Se o segundo teste de rastreio for positivo, confirma-se, então, a suspeita (ocorrência suspeita) e devem continuar-se os testes de acordo com o esquema. Caso o segundo teste de rastreio seja negativo, a amostra é, então, considerada não contaminada por Cms.

Por isso, tal como referido no n.º 2 do artigo 4.º, um teste IF positivo é definido por uma leitura IF positiva confirmada por um segundo teste de rastreio (PCR/ /FISH).

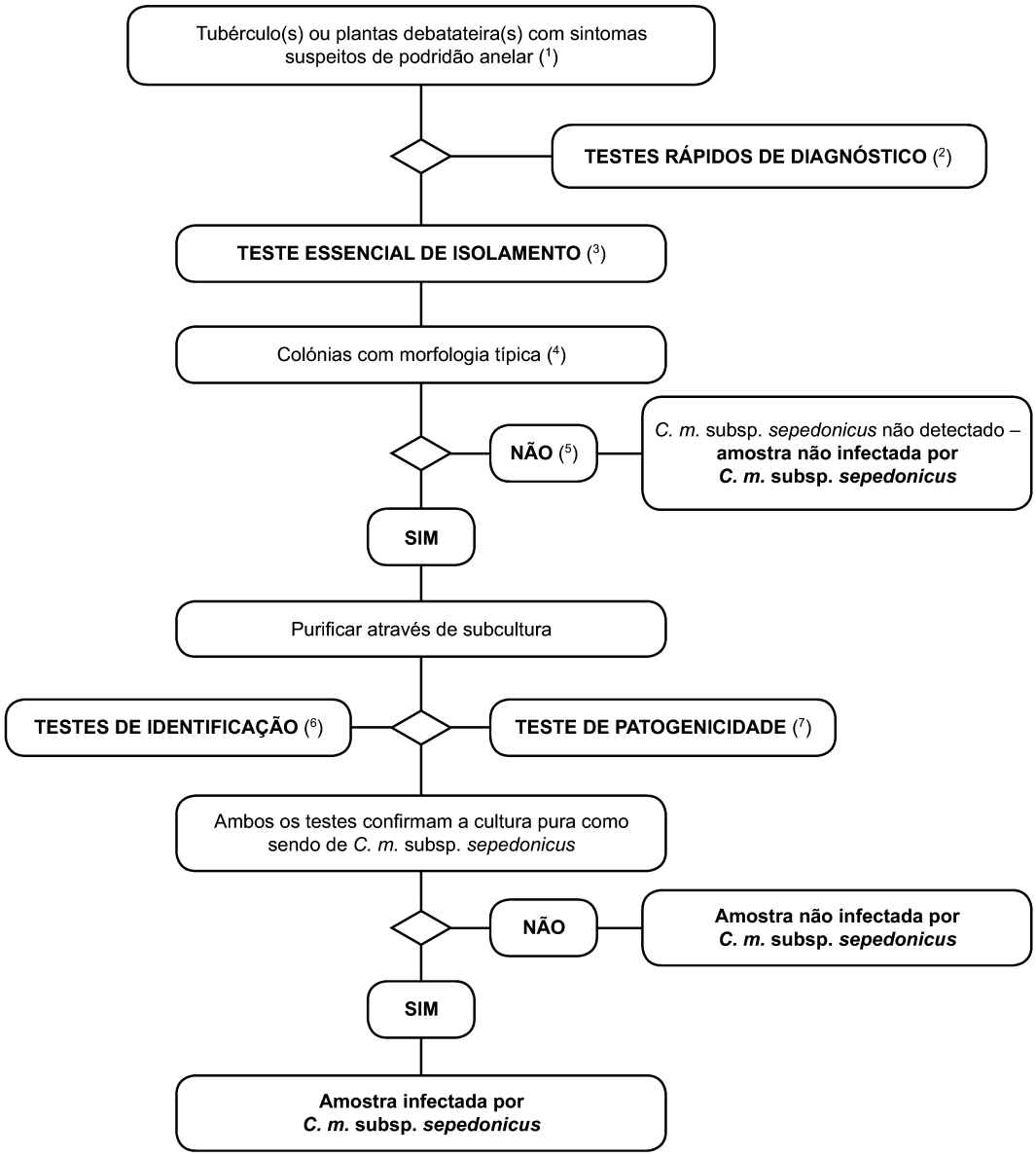
A presença confirmada, tal como referido no n.º 1 do artigo 5.º da Directiva 93/85/CEE, implica o isolamento e identificação de uma cultura pura de *C. m.* subsp. *sepedonicus* com confirmação de patogenicidade.

1. APRESENTAÇÃO DO FLUXOGRAMA

1.1. **Esquema para o diagnóstico de podridão anelar em tubérculos e plantas de batateira que apresentem sintomas de podridão anelar**

O procedimento laboratorial destina-se à análise de tubérculos e plantas de batateira que apresentem sintomas típicos ou suspeitos de podridão anelar. Compreende um teste rápido de rastreio, isolamento do patogéneo a partir de tecido vascular infectado em meios de cultura adequados e, em caso de resultado positivo, identificação da cultura como *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

▼**M1**



(1) A descrição dos sintomas é apresentada na secção 2.

(2) O testes adequados são:
— teste IF (secção 4);
— teste PCR (secção 6);
— teste FISH (secção 5).

(3) Embora o isolamento por diluição em placas do patogéneo proveniente de material vegetal que apresente sintomas típicos seja simples, poderá não ser possível isolar a bactéria a partir de material vegetal em fase avançada de infecção devido à competição e/ou excessivo desenvolvimento de colónias de bactérias saprófitas. Por conseguinte, recomenda-se a utilização de meios de cultura não selectivos e selectivos, de preferência MTNA (secção 8), bem como de um bioensaio (secção 7).

(4) A descrição da morfologia típica da colónia é apresentada na secção 8.

(5) Se o teste de isolamento for negativo, apesar de os sintomas de doença serem típicos, deverá repetir-se o isolamento.

(6) Obtém-se uma identificação fiável de uma cultura pura de *C. m.* subsp. *sepedonicus* através da realização dos testes referidos na secção 9.

(7) O teste de patogenicidade é descrito na secção 10.

▼**M1**

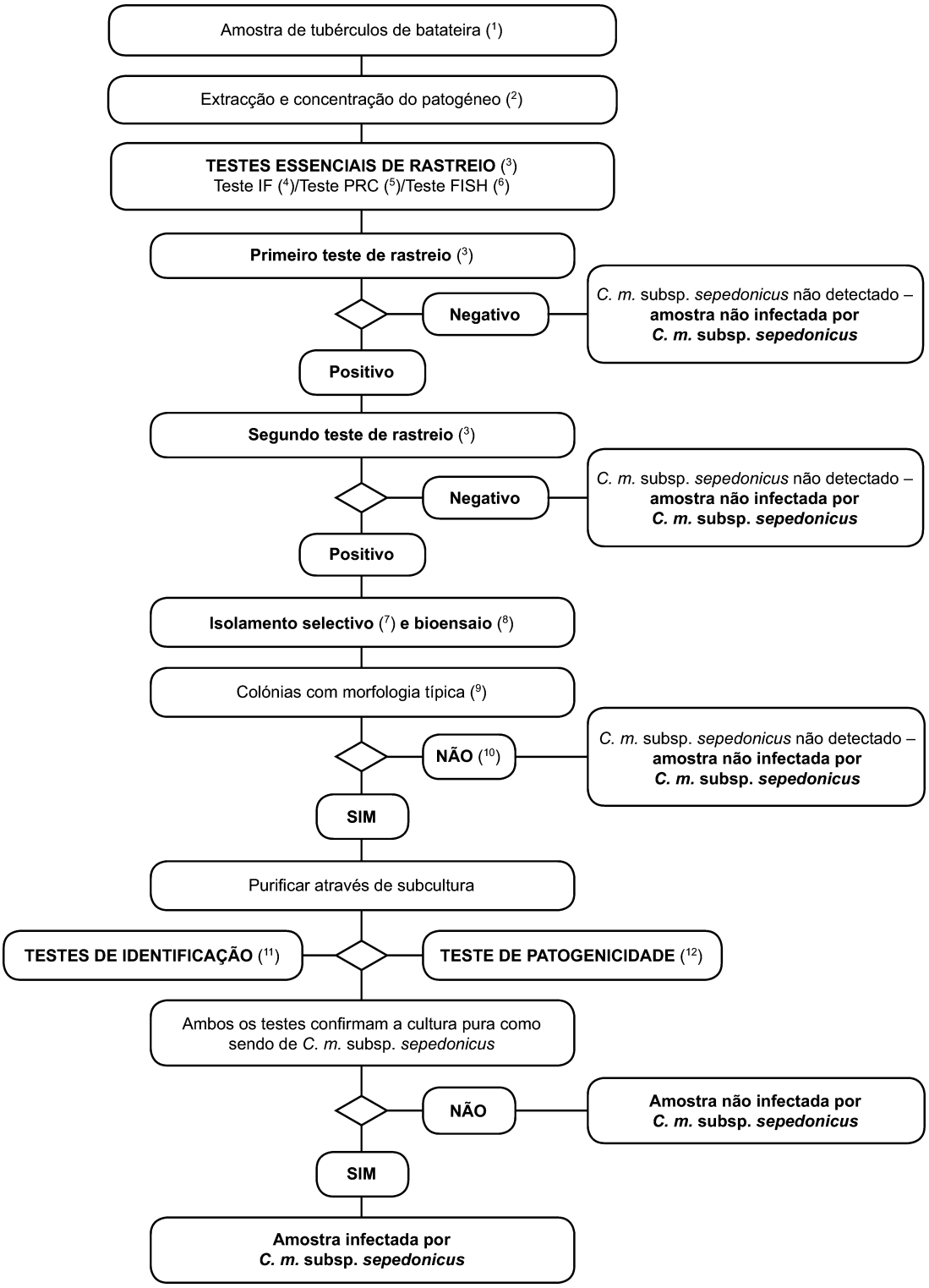
1.2. **Esquema para detecção e identificação de** *Clavibacter michiganensis* **subsp.** *sepedonicus* **em amostras de tubérculos de batateira assintomáticos**

Princípio

O procedimento laboratorial destina-se à detecção de infecções latentes em tubérculos de batateira. Um resultado positivo em, pelo menos, dois testes de rastreio baseados em princípios biológicos distintos tem de ser complementado pelo isolamento do patogéneo, seguido de, em caso de isolamento de colónias típicas, confirmação da identificação da cultura pura como sendo de *C. m.* subsp. *sepedonicus*. Um resultado positivo em apenas um dos testes de rastreio não é suficiente para considerar a amostra como suspeita.

Os testes de rastreio e de isolamento devem permitir um limiar de detecção de 10^3 a 10^4 células por ml de sedimento ressuspenso, incluídas como controlos positivos em cada série de testes.

▼M1


Amostra de tubérculos de batateira (1)
Extracção e concentração do patogéneo (2)
TESTES ESSENCIAIS DE RASTREIO (3)
Teste IF (4)/Teste PRC (5)/Teste FISH (6)
Primeiro teste de rastreio (3)
Negativo
C. m. subsp. sepedonicus não detectado – amostra não infectada por C. m. subsp. sepedonicus
Positivo
Segundo teste de rastreio (3)
Negativo
C. m. subsp. sepedonicus não detectado – amostra não infectada por C. m. subsp. sepedonicus
Positivo
Isolamento selectivo (7) e bioensaio (8)
Colónias com morfologia típica (9)
NÃO (10)
C. m. subsp. sepedonicus não detectado – amostra não infectada por C. m. subsp. sepedonicus
SIM
Purificar através de subcultura
TESTES DE IDENTIFICAÇÃO (11)
TESTE DE PATOGENICIDADE (12)
Ambos os testes confirmam a cultura pura como sendo de C. m. subsp. sepedonicus
NÃO
Amostra não infectada por C. m. subsp. sepedonicus
SIM
Amostra infectada por C. m. subsp. sepedonicus

▼**M1**

(1) A dimensão normal da amostra é de 200 tubérculos, apesar de o procedimento poder ser utilizado com amostras mais pequenas caso não se disponha de 200 tubérculos.

(2) Os métodos de extracção e concentração do patogéneo são descritos no ponto 3.1.

(3) Se, pelo menos, dois testes baseados em princípios biológicos diferentes forem positivos, deverá proceder-se ao isolamento e à confirmação. Efectuar, pelo menos, um teste de rastreio. Sempre que este teste for negativo, a amostra é considerada negativa. Caso este teste se revele positivo, são necessários um segundo ou mais testes de rastreio baseados em princípios biológicos diferentes, no sentido de verificar o primeiro resultado positivo. Caso o segundo teste, ou qualquer outro dos testes efectuados, seja negativo, a amostra é considerada negativa. Não são necessários outros testes.

(4) Teste de imunofluorescência (IF).
Utilizar sempre para o rastreio por IF um anticorpo policlonal, podendo anticorpos monoclonais adicionais fornecer uma maior especificidade (ver secção 4).

(5) Teste PCR.
Utilizar os reagentes e protocolos PCR adequadamente validados (ver secção 6).

(6) Teste FISH.
Utilizar reagentes e protocolos validados (ver secção 5).

(7) Isolamento selectivo.
A utilização dos meios MTNA ou NCP-88 e uma diluição de 1/100 do sedimento ressuspenso constitui, em muitos casos, um método adequado para o isolamento directo de *C. m.* subsp. *sepedonicus*. Podem obter-se colónias típicas 3 a 10 dias após diluição em placas. Nessa altura, o patogéneo pode ser purificado e identificado. Para tirar o máximo partido das suas capacidades, o teste requer uma preparação cuidada dos cones dos hilos, de forma a evitar a proliferação de bactérias saprófitas associadas aos tubérculos da batateira, bactérias essas que são concorrentes com *C. m.* subsp. *sepedonicus* nos meios e que podem desenvolver-se em maior número do que o patogéneo. Caso o teste de diluição em placas não seja bem sucedido, deve efectuar-se o isolamento a partir das plantas utilizadas no bioensaio (ver secção 8).

(8) O bioensaio é utilizado para o isolamento de *C. m.* subsp. *sepedonicus* a partir de sedimentos de extractos de batateira, através de um enriquecimento selectivo em beringelas (*Solanum melongena*). O teste requer condições óptimas de incubação, especificadas neste método. Não é provável que bactérias inibidoras de *C. m.* subsp. *sepedonicus* nos meios MTNA ou NCP-88 interfiram nos resultados deste teste (ver secção 7).

(9) A morfologia típica das colónias é descrita na secção 8.

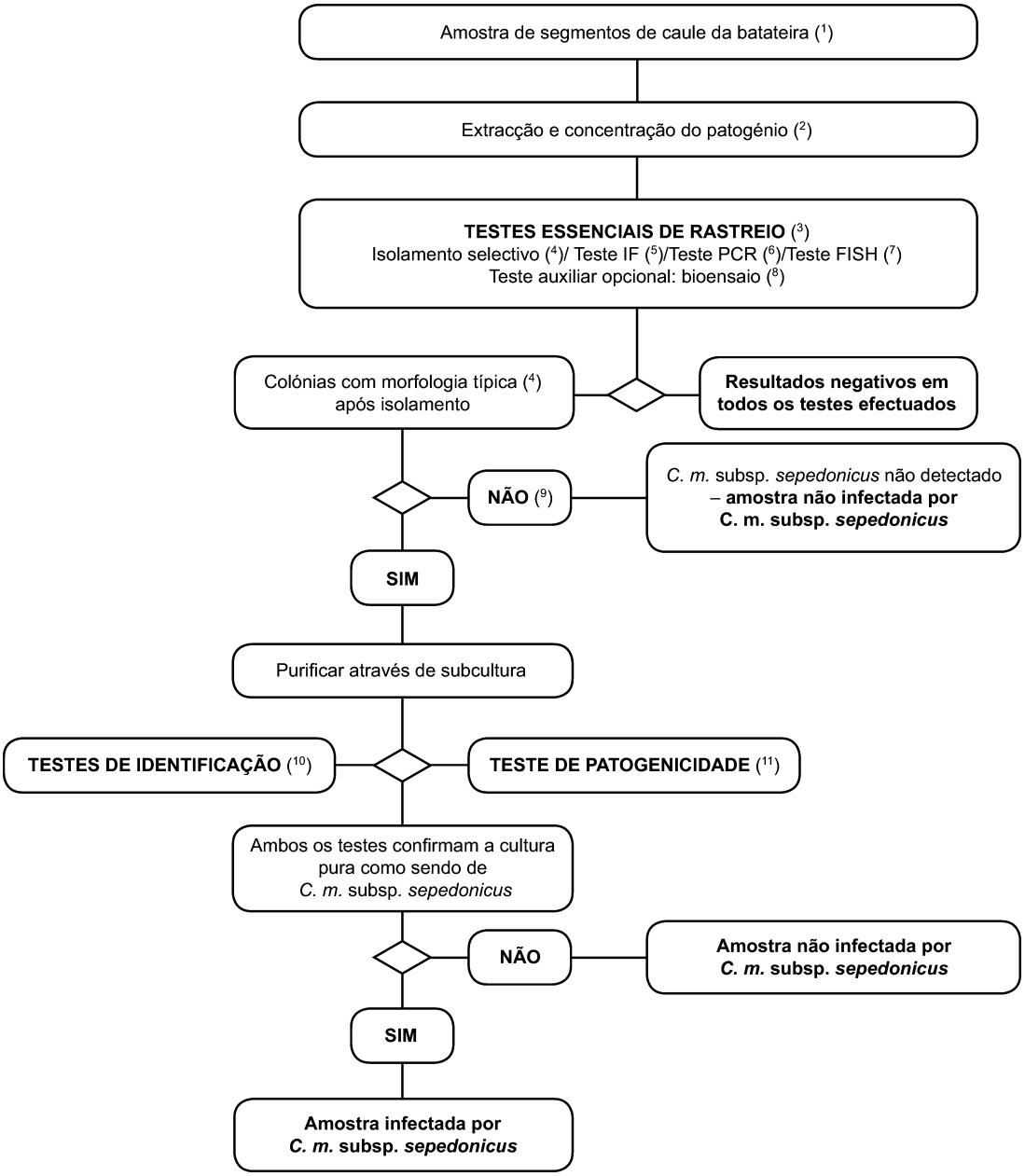
(10) O isolamento ou os bioensaios podem conduzir à obtenção de falsos resultados negativos devido à competição ou inibição por bactérias saprófitas. Caso se obtenham resultados positivos claros nos testes de rastreio, mas os testes de isolamento sejam negativos, deverão repetir-se os testes de isolamento a partir do mesmo sedimento ou através da colheita de tecido vascular adicional da zona do hilo de tubérculos já cortados da mesma amostra e, se necessário, analisar amostras adicionais.

(11) Consegue-se a identificação fiável de presumíveis culturas puras de *C. m.* subsp. *sepedonicus,* através da utilização dos testes referidos na secção 9.

(12) O teste de patogenicidade é apresentado na secção 10.

▼M1

1.3. **Esquema para detecção e identificação de** *Clavibacter michiganensis* **subsp.** *sepedonicus* **em amostras de plantas de batateira assintomáticas**



▼**M1**

(1) Ver ponto 3.2 para a dimensão recomendada das amostras.

(2) Os métodos de extracção e concentração do patogéneo são descritos no ponto 3.2.

(3) Caso, pelo menos, dois testes baseados em princípios biológicos diferentes sejam positivos, tem de se efectuar o isolamento do patogéneo e a confirmação da sua identificação.
Efectuar, pelo menos, um teste de rastreio. Sempre que este teste for negativo, a amostra é considerada negativa. Caso este teste se revele positivo, são necessários um segundo ou mais testes de rastreio baseados em princípios biológicos diferentes, no sentido de verificar o primeiro resultado positivo. Caso o segundo teste, ou qualquer outro dos testes efectuados sejam negativos, a amostra é considerada negativa. Não são necessários outros testes.

(4) O teste de isolamento selectivo e a morfologia típica das colónias são descritos na secção 8.

(5) O teste IF é descrito na secção 4.

(6) O teste PCR é descrito na secção 6.

(7) O teste FISH é descrito na secção 5.

(8) O bioensaio é descrito na secção 7.

(9) O isolamento ou os bioensaios podem conduzir à obtenção de falsos resultados negativos devido à competição ou inibição por bactérias saprófitas. Caso se obtenham resultados positivos nos testes de rastreio, mas os testes de isolamento sejam negativos, deverão repetir-se os testes de isolamento e, se necessário, analisar amostras adicionais.

(10) Consegue-se a identificação fiável de presumíveis culturas puras de *C. m.* subsp. *sepedonicus,* através da utilização dos testes referidos na secção 9.

(11) O teste de patogenicidade é apresentado na secção 10.

▼M1

2. OBSERVAÇÃO VISUAL DOS SINTOMAS DE PODRIDÃO ANELAR

2.1. **Plantas de batateira**

Tendo em conta as condições climáticas europeias, os sintomas raramente se observam no campo e, frequentemente, apenas no final do ciclo vegetativo. Além disso, os sintomas são frequentemente mascarados ou confundidos com os provocados por outras doenças, ou causados por senescência ou ainda por danos mecânicos. Por este motivo, pode não ser fácil detectar os sintomas no decurso das inspecções de campo. Os sintomas de murchidão são muito diferentes dos causados pelo pus ou mal murcho; a murchidão é normalmente lenta e limita-se inicialmente às margens da folha. As folhas novas infectadas continuam frequentemente a expandir-se, apesar de esta expansão ser menor nas zonas infectadas. Este fenómeno dá origem a folhas com formatos fora do normal. As folhas afectadas pela obstrução dos tecidos vasculares localizados em zonas inferiores do caule desenvolvem com frequência, entre as nervuras, áreas cloróticas, amarelas a alaranjadas. Os folíolos, as folhas desenvolvidas e até os caules infectados podem, eventualmente, morrer. Frequentemente, as folhas e os tubérculos podem apenas apresentar um tamanho reduzido. Ocasionalmente, as plantas apresentam nanismo. Podem encontrar-se imagens a cores de um conjunto de sintomas no sítio *web* http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

2.2. **Tubérculos de batateira**

Os primeiros sintomas observam-se nos tecidos que envolvem o anel vascular, particularmente nas imediações da zona do hilo, que se apresentam ligeiramente vidrados ou translúcidos, sem podridões. O anel vascular à volta do hilo pode ter uma cor ligeiramente mais escura do que o normal. O primeiro sintoma facilmente identificável é a coloração amarelada do anel vascular e, quando se pressiona suavemente o tubérculo, emerge dos vasos um exsudado sob a forma de fitas. Esta exsudação contém milhões de bactérias. O tecido vascular pode tornar-se acastanhado e os sintomas no tubérculo, nesta fase, são semelhantes aos do pus ou mal murcho provocado por *Ralstonia solanacearum.* No início, estes sintomas podem limitar-se a uma parte do anel, não necessariamente perto do hilo, e, em seguida, podem progredir gradualmente, atingindo todo o anel. À medida que a infecção progride, dá-se a destruição do tecido vascular e o córtex externo pode separar-se do córtex interno. Nos estádios mais avançados da infecção, surgem fissuras na superfície do tubérculo, frequentemente castanhas/avermelhadas nas margens. Registaram-se recentemente na Europa vários casos em que o córtex central apodrece ao mesmo tempo que o anel vascular, o que resulta numa invasão secundária com perfurações internas e necroses. Os sintomas podem ser camuflados por invasões por fungos ou bactérias secundárias, e pode ser difícil, ou mesmo impossível, distinguir os sintomas da podridão anelar numa fase avançada de qualquer outra podridão dos tubérculos. Existe a possibilidade de se verificarem sintomas atípicos. Podem encontrar-se imagens a cores de um conjunto de sintomas no sítio *web* http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

3. Preparação da amostra

3.1. **Tubérculos de bateira**

Nota:

— A dimensão normal da amostra é de 200 tubérculos por teste. Uma amostragem mais intensiva exige a realização de mais testes em amostras desta dimensão. Uma amostra com um maior número de tubérculos conduzirá à incapacidade ou a uma maior dificuldade em termos de interpretação dos resultados. Contudo, este procedimento pode ser aplicado a amostras com menos de 200 tubérculos, sempre que este número de tubérculos não se encontre disponível.

— A validação de todos os métodos de detecção abaixo descritos tem por base a análise de amostras constituídas por 200 tubérculos.

— O extracto de batata descrito em seguida pode também ser utilizado para a detecção da bactéria *Ralstonia solanacearum*, bactéria responsável pela doença do pus ou mal murcho da batateira.

Pré-tratamento opcional antes da preparação da amostra:

Lavar os tubérculos. Utilizar os desinfectantes (compostos de cloro sempre que se utilizar o teste PCR, para destruir ADN de organismos saprófitas) e detergentes adequados entre cada amostra. Secar os tubér-

▼M1

culos ao ar. Este procedimento de lavagem é útil (mas não obrigatório), em especial para amostras que apresentam um excesso de terra e quando se pretender utilizar um teste PCR ou um isolamento directo.

3.1.1. Remover a epiderme na zona do hilo de cada tubérculo com um bisturi ou faca de cortar legumes, limpos e desinfectados, para que o tecido vascular fique visível. Retirar cuidadosamente um pequeno cone de tecido vascular na zona do hilo, reduzindo ao mínimo a quantidade de tecido não vascular (ver sítio *web* http://forum.europa.eu.int/ /Public/irc/sanco/Home/main

Nota:

Pôr de lado qualquer tubérculo que exiba sintomas suspeitos de podridão anelar e testá-los separadamente.

Caso se observem sintomas suspeitos de podridão anelar durante a remoção do cone da zona do hilo, o tubérculo em questão deve ser visualmente inspeccionado após o corte próximo do hilo. Qualquer tubérculo cortado exibindo sintomas suspeitos deverá ser suberizado durante 2 dias à temperatura ambiente e armazenado em quarentena (entre 4° a 10 °C) até todos os testes terem sido concluídos. Todos os tubérculos da amostra (incluindo os que apresentam sintomas suspeitos) devem ser conservados de acordo com o anexo II.

3.1.2. Colocar os cones dos hilos em recipientes descartáveis não utilizados que possam ser fechados e/ou selados (caso os recipientes sejam reutilizados devem ser cuidadosamente limpos e desinfectados com compostos de cloro). Os cones dos hilos devem ser, de preferência, processados de imediato. Se tal não for possível, deverão ser mantidos no recipiente, sem adição de tampão, em local refrigerado durante, no máximo, 72 horas ou 24 horas à temperatura ambiente. A secagem e a suberização dos cones, bem como o desenvolvimento de saprófitas durante o armazenamento, podem impedir a detecção da bactéria da podridão anelar.

3.1.3. Processar os cones dos hilos de acordo com um dos seguintes procedimentos:

a) Cobrir os cones com um volume suficiente (cerca de 40 ml) de tampão de extracção (apêndice 3) e colocá-los num agitador rotativo (50-100 rpm) durante 4 horas a uma temperatura inferior a 24 ° C ou durante 16-24 horas refrigerados,

ou

b) Homogeneizar os cones com um volume suficiente (cerca de 40 ml) de tampão de extracção (apêndice 3) num misturador (por exemplo, Waring Blender ou Ultra Thurrax) ou por esmagamento num saco de maceração descartável selado (por exemplo, Stomacher ou Bioreba em polietileno resistente, de 150 mm x 250 mm, esterilizado por radiação) utilizando um macete de borracha ou um instrumento de trituração adequado (por exemplo, Homex).

Nota:

O risco de contaminação cruzada das amostras é elevado quando estas são homogeneizadas com recurso a um misturador. Tomar as precauções necessárias para evitar a formação de aerossóis ou derrames durante o processo de extracção. Assegurar-se de que as lâminas e os recipientes do misturador utilizados para cada amostra foram recentemente esterilizados. Caso se utilize o teste PCR, evitar a contaminação por ADN dos recipientes ou instrumento de trituração. Sempre que se utilize o teste PCR, recomenda-se a trituração em sacos descartáveis e a utilização de tubos descartáveis.

3.1.4. Decantar o sobrenadante. Caso se encontre excessivamente turvo, clarificar através de centrifugação a baixa velocidade (a não mais de 180 g durante 10 minutos a uma temperatura entre 4 e 10 °C) ou de filtração por vácuo (40-100 µm), lavando o filtro com tampão de extracção adicional (10 ml) (apêndice 3).

3.1.5. Concentrar a fracção bacteriana por centrifugação a 7 000 g durante 15 minutos (ou 10 000 g durante 10 minutos) a uma temperatura compreendida entre 4 e 10 °C e desprezar o sobrenadante sem perturbar o sedimento.

3.1.6. Ressuspender o sedimento em 1,5 ml de tampão de ressuspensão (apêndice 3). Utilizar 500 µl para o teste de detecção de *C. m.* subsp. *sepedonicus*, 500 µl para o teste de detecção de *Ralstonia solanacearum* e 500 µl para fins de referência. Adicionar glicerol esterilizado até obter uma concentração final de 10-25 % (v/v) aos 500 µl das alíquotas de referência e à alíquota remanescente da amostra em

▼M1

estudo; agitar em vórtice e armazenar entre -16 e –24 °C (semanas) ou entre –68 e –86° C (meses). Manter a alíquota remanescente da amostra em estudo a uma temperatura entre 4 e 10 °C durante o período de ensaio.

Não se aconselha a congelação e descongelação repetidas.

Caso seja necessário transportar o extracto, garantir a entrega numa caixa refrigerada num prazo de 24 a 48 horas.

3.1.7. É indispensável que as amostras e os controlos positivos de *C. m.* subsp. *sepedonicus* sejam tratados separadamente para evitar contaminações. O mesmo se aplica às lâminas de imunofluorescência e a todos os testes.

3.2. **Plantas de batateira**

Nota:

Para a detecção de populações latentes de *C. m.* subsp. *sepedonicus*, é aconselhável a análise de amostras compostas. O procedimento pode ser aplicado convenientemente a amostras compostas contendo até 200 partes de caule. (Sempre que forem realizadas prospecções, estas devem basear-se numa amostra estatisticamente representativa da população de plantas em estudo.)

3.2.1. Com uma faca ou uma tesoura de poda limpas e desinfectadas, remover um segmente de 1-2 cm da base de cada caule, imediatamente acima do nível do solo.

Desinfectar rapidamente os segmentos de caule com etanol a 70 % e secá-los imediatamente com papel de filtro.

Recolher os segmentos de caule num recipiente esterilizado fechado, de acordo com os seguintes procedimentos de amostragem:

3.2.2. Processar os segmentos de caule de acordo com um dos seguintes procedimentos:

a) Cobrir os segmentos com um volume suficiente (cerca de 40 ml) de tampão de extracção (apêndice 3) e colocá-los num agitador rotativo (50-100 rpm) durante 4 horas a menos de 24 °C ou durante 16-24 horas em local refrigerado,

ou

b) Processar imediatamente, esmagando os segmentos num saco de maceração resistente (por exemplo, Stomacher ou Bioreba) com um volume adequado de tampão de extracção (apêndice 3), com recurso a um macete de borracha ou um instrumento de trituração adequado (por exemplo, Homex). Se tal não for possível, armazenar os segmentos de caule refrigerados durante, no máximo, 72 horas ou 24 horas à temperatura ambiente.

3.2.3. Decantar o sobrenadante após 15 minutos de repouso.

3.2.4. Não é normalmente necessário proceder à clarificação do extracto ou à concentração da fracção bacteriana, mas estes objectivos poderão alcançar-se através de filtração e/ou centrifugação, tal como descrito nos pontos 3.1.4 a 3.1.6.

3.2.5. Dividir o extracto puro ou concentrado da amostra em duas partes iguais. Manter uma metade a uma temperatura de 4 a 10 °C durante a realização dos testes e armazenar a outra metade com 10-25 % (v/v) de glicerol esterilizado a uma temperatura compreendida entre –16 e –24 °C (semanas) ou –68 e –86 °C (meses), caso seja necessário proceder a mais testes.

4. TESTE IF

Princípio

A utilização do teste IF como teste de rastreio principal é recomendada, tendo em conta a sua robustez comprovada para alcançar os limiares de detecção exigidos.

Sempre que se utilize o teste IF como teste de rastreio principal e o seu resultado seja positivo, terá de se realizar o teste PCR ou o teste FISH como segundo teste de rastreio. Sempre que se utilize o teste IF como segundo teste de rastreio e o seu resultado seja positivo, terão de se realizar mais testes de acordo com o fluxograma para completar a análise.

▼M1

Nota:

Utilizar sempre um anticorpo policlonal quando o teste IF for usado como principal teste de rastreio. No caso de se obter um resultado positivo no teste IF com um anticorpo policlonal, as amostras poderão ser submetidas a novos testes com um anticorpo monoclonal que, embora apresente uma maior especificidade, pode ser menos sensível.

Utilizar anticorpos contra uma estirpe de referência de *C. m.* subsp. *sepedonicus*. Recomenda-se a determinação do título para cada novo lote de anticorpos. O título é definido como a diluição mais elevada para a qual se verifica uma reacção óptima ao testar uma suspensão contendo 10^5 a 10^6 células por ml da estirpe homóloga de *C. m.* subsp. *spedonicus*, e recorrendo a um conjugado de isotiocianato de fluoresceína (FITC), de acordo com as recomendações do fabricante. Os anticorpos policlonais ou monoclonais nativos devem possuir um título IF de, pelo menos, 1:2 000. Durante o teste, os anticorpos devem ser utilizados em diluições de trabalho (DT) próximas do título ou no seu valor exacto. Utilizar anticorpos validados (ver sítio *web* http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

O teste deve ser realizado com extractos de amostras recentemente preparados. Se necessário, pode ser executado com sucesso em extractos armazenados entre -68 e -86 °C e conservados em glicerol. O glicerol pode ser retirado da amostra através da adição de 1 ml de tampão de ressuspensão (apêndice 4), nova centrifugação durante 15 minutos a 7 000 g e ressuspensão num volume igual de tampão de ressuspensão. Este procedimento é frequentemente desnecessário, em especial se as lâminas forem fixadas à chama (ver 2.2).

Preparar lâminas de controlo positivo em separado com uma estirpe homóloga, ou qualquer outra estirpe de referência de *C. m.* subsp. *sepedonicus* suspensa em extracto de batata, tal como especificado no apêndice 2 e, opcionalmente, em tampão.

Sempre que possível, deve também ser utilizado material vegetal naturalmente infectado (liofilizado ou congelado a uma temperatura compreendida entre –16 e –24 °C) como controlo positivo na mesma lâmina.

Como controlos negativos, utilizar alíquotas de extracto de amostra que anteriormente se tenham revelado negativas relativamente à presença de *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

Utilizar lâminas de microscópio com vários poços, de preferência 10, com, pelo menos, 6 mm de diâmetro cada.

Testar o material de controlo de forma idêntica à da(s) amostra(s).

4.1. Preparar as lâminas através de um dos seguintes procedimentos:

i) Para sedimentos com relativamente pouco amido:

Pipetar um volume-padrão (15 µl é adequado para poços com 6 mm de diâmetro - aumentar o volume proporcionalmente à dimensão dos poços) de uma diluição de 1/100 do sedimento de batata ressuspenso no primeiro poço. Em seguida, pipetar um volume semelhante de sedimento não diluído (1/1) nos restantes poços da fila. A segunda fila de poços pode ser utilizada como um duplicado ou para outra amostra, como indicado na figura 1.

ii) Para outros sedimentos:

Preparar diluições decimais (1/10 e 1/100) do sedimento ressuspenso em tampão de ressuspensão. Pipetar um volume-padrão (15 µl é adequado para poços com 6 mm de diâmetro - aumentar o volume proporcionalmente à dimensão dos poços) do sedimento ressuspenso e de cada uma das diluições numa fila de poços. A segunda fila de poços pode ser utilizada como um duplicado ou para outra amostra, como indicado na figura 2.

4.2. Secar as gotículas à temperatura ambiente ou por aquecimento a uma temperatura compreendida entre 40º e 45 °C. Fixar as células bacterianas na lâmina através de aquecimento (15 minutos a 60 °C), à chama, com etanol a 95 %, ou em conformidade com instruções específicas dos fornecedores dos anticorpos.

Se necessário, as lâminas assim tratadas podem ser armazenadas congeladas numa caixa de dessecação durante o menor tempo possível (até um máximo de 3 meses) antes de serem testadas.

4.3. Procedimento IF

i) De acordo com a preparação da lâmina descrita na alínea i) do ponto 4.1:

▼M1

Preparar um conjunto de diluições a 1/2 do anticorpo em tampão IF. O primeiro poço deverá ter 1/2 do título (T/2), os restantes 1/4 do título (T/4), 1/2 do título (T/2), o título (T) e o dobro do título (2T).

ii) De acordo com a preparação da lâmina descrita na alínea ii) do ponto 4.1:

Preparar a diluição de trabalho (DT) do anticorpo em tampão IF. A diluição de trabalho afecta a especificidade.

Figura 1. Preparação da lâmina de acordo com a alínea i) do ponto 4.1 e a alínea i) do ponto 4.3.

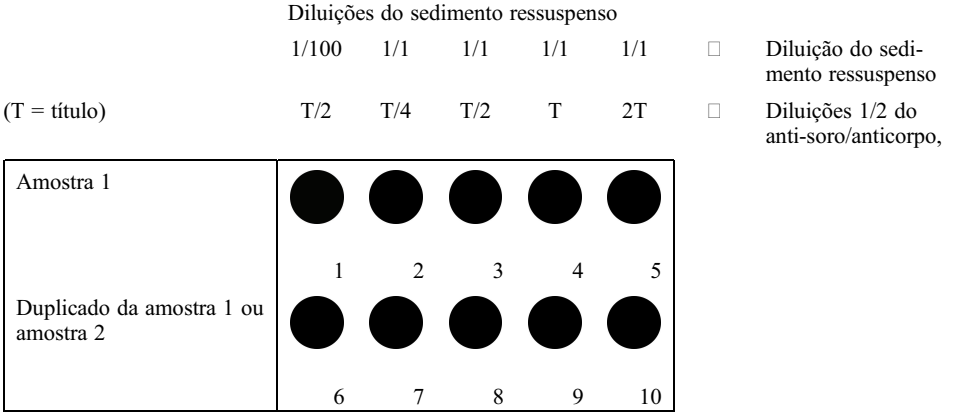
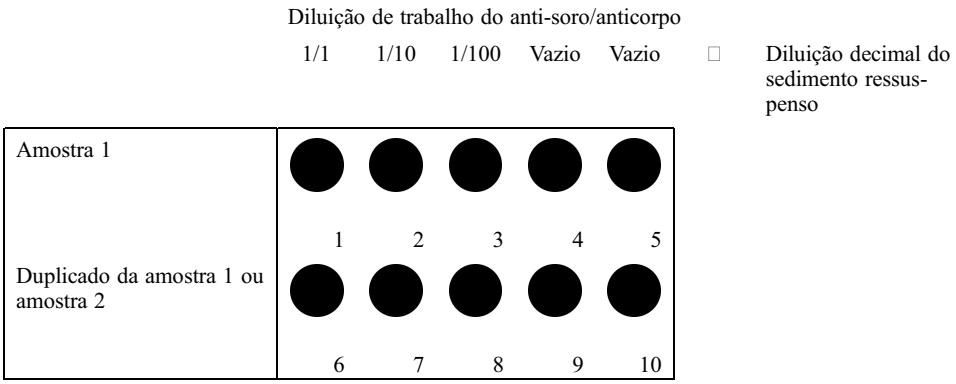


Figura 2. Preparação da lâmina de acordo com a alínea ii) do ponto 4.1 e a alínea ii) do ponto 4.3.



4.3.1. Dispor as lâminas sobre papel de filtro humedecido. Cobrir por completo cada poço contendo a amostra a testar com a(s) diluição (ões) de anticorpo. O volume de anticorpo adicionado a cada poço deve ser, pelo menos, igual ao volume de extracto aplicado.

O procedimento seguinte deverá ser efectuado na ausência de instruções específicas dos fornecedores dos anticorpos:

4.3.2. Incubar as lâminas sobre papel de filtro humedecido durante 30 minutos à temperatura ambiente (18 a 25 °C) numa caixa fechada.

4.3.3. Sacudir as gotículas da lâmina e lavar cuidadosamente com tampão IF. Lavar por submersão durante 5 minutos em tampão IF-Tween (apêndice 3) e subsequentemente durante 5 minutos em tampão IF. Evitar a transferência de aerossóis ou de gotículas, o que poderia dar origem a uma contaminação cruzada. Eliminar cuidadosamente a humidade em excesso, secando suavemente com papel absorvente.

4.3.4. Dispor as lâminas sobre papel de filtro humedecido. Cobrir os poços contendo as amostras a testar com a diluição do conjugado FITC utilizada para determinar o título. O volume de conjugado FITC adicionado aos poços deve ser idêntico ao volume de anticorpo utilizado.

4.3.5. Incubar as lâminas sobre papel de filtro humedecido durante 30 minutos à temperatura ambiente (18 a 25 °C) numa caixa opaca fechada.

▼M1

4.3.6. Sacudir da lâmina as gotículas de conjugado FITC. Lavar como anteriormente (ponto 4.3.3).

Retirar cuidadosamente o excesso de humidade.

4.3.7. Pipetar para cada poço 5-10 µl de uma solução de tampão fosfato 0,1 M com glicerol (apêndice 3) ou de um líquido de montagem disponível no mercado que evite a perda rápida de fluorescência e cobrir com uma lamela.

4.4. Leitura do teste IF:

4.4.1. Examinar as lâminas do teste num microscópio de epifluorescência, com filtros adequados para excitação do FITC, utilizando uma lente de imersão em óleo ou água, com uma ampliação de 500-1 000x. Examinar os poços ao longo de dois diâmetros perpendiculares e à volta do perímetro. Para amostras que não revelem células, ou cujo número seja reduzido, observar, pelo menos, 40 campos do microscópio.

Observar primeiro a lâmina do controlo positivo. As células devem apresentar-se com uma fluorescência brilhante e completamente coradas no título do anticorpo ou diluição de trabalho determinados. O teste IF (secção 4) deve ser repetido se a coloração for aberrante.

4.4.2. Observar células fluorescentes brilhantes com a morfologia característica de *C. m.* subsp. *sepedonicus* nos poços das lâminas em estudo (ver sítio *web* http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). A intensidade de fluorescência deve ser equivalente à da estirpe do controlo positivo, ou melhor do que esta, para a mesma diluição do anticorpo. As células com coloração incompleta ou com fluorescência fraca não devem ser consideradas.

Caso se suspeite de qualquer contaminação, o teste deve ser repetido. Este poderá ser o caso quando todas as lâminas de um lote, revelem células positivas devido à contaminação do tampão ou se forem encontradas células positivas (fora do poço da lâmina) no revestimento da lâmina.

4.4.3. Há vários problemas inerentes à especificidade do teste de imunofluorescência. Em sedimentos de cones de hilo e de segmentos de caule da batateira, é possível a ocorrência de populações de células fluorescentes com morfologia atípica e reacções cruzadas de bactérias saprófitas com dimensões e morfologia semelhantes a *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

4.4.4. Considerar apenas células fluorescentes com dimensões e morfologia típicas no título ou na diluição de trabalho dos anticorpos, tal como descrito em 4.3.

4.4.5. Interpretação do teste IF:

i) Se forem detectadas células fluorescentes brilhantes e com a morfologia característica, determinar o número médio de células típicas por cada campo do microscópio e calcular o número de células típicas por ml de sedimento ressuspenso (apêndice 4).

A leitura do teste IF revela um resultado positivo para amostras com, pelo menos, 5×10^3 de células típicas por ml de sedimento ressuspenso. A amostra é considerada como potencialmente contaminada, sendo necessário efectuar outros testes.

ii) A leitura do teste IF revela um resultado negativo para amostras com menos de 5×10^3 de células por ml de sedimento ressuspenso, sendo a amostra considerada negativa. A realização de outros testes não é obrigatória.

5. TESTE FISH

Princípio

Sempre que se utilize o teste FISH como primeiro teste de rastreio e o seu resultado seja positivo, terá de se realizar o teste IF como segundo teste obrigatório de rastreio. Sempre que se utilize o teste FISH como segundo teste de rastreio e o seu resultado seja positivo, terão de se realizar mais testes de acordo com fluxograma para completar o diagnóstico.

▼**M1**

Nota:

Utilizar sondas validadas específicas para *C. m.* subsp. *sepedonicus* (apêndice 7). O teste preliminar com este método deveria permitir a detecção reprodutível de, pelo menos, 10^3-10^4 células de *C. m.* subsp. *sepedonicus* por ml adicionadas a extractos de amostras que anteriormente se tenham revelado negativos.

O procedimento seguinte deverá ser realizado, de preferência, com um extracto de amostra preparado na altura da utilização, mas pode também ser realizado com sucesso com um extracto de amostra que tenha sido armazenado em glicerol a uma temperatura compreendida entre –16 e –24 °C ou –68 e -86 °C.

Como controlos negativos, utilizar alíquotas de extracto de amostra que tenha anteriormente sido testado com resultado negativo para *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

Como controlos positivos preparar suspensões contendo 10^5 a 10^6 células de *C. m.* subsp. *sepedonicus* por ml provenientes de uma cultura com 3 a 5 dias (por exemplo, estirpe NCPPB 4053 ou PD 406) em tampão fosfato (PB) 0,01 M (para a preparação ver apêndice 2). Preparar lâminas de controlo positivo em separado com a estirpe homóloga, ou qualquer outra estirpe de referência de *C. m.* subsp. *sepedonicus* suspensa em extracto de batata, tal como especificado no apêndice 2.

A utilização de sondas para eubactérias marcadas com FITC oferece um controlo para o processo de hibridação, visto que todas as eubactérias presentes na amostra ficarão coradas.

Testar o material de controlo de forma idêntica à da(s) amostra(s).

5.1. **Fixação do extracto de batata**

O protocolo seguinte tem por base Wullings *et al.*, (1998):

5.1.1. Preparar a solução fixadora (ver apêndice 7).

5.1.2. Pipetar 100 µl de cada extracto de amostra para um tubo Eppendorf e centrifugar durante 8 minutos a 7 000 g.

5.1.3. Remover o sobrenadante e dissolver o sedimento em 500 µl de fixador preparado há menos de 24 horas. Agitar em vórtice e incubar até ao dia seguinte a 4 °C.

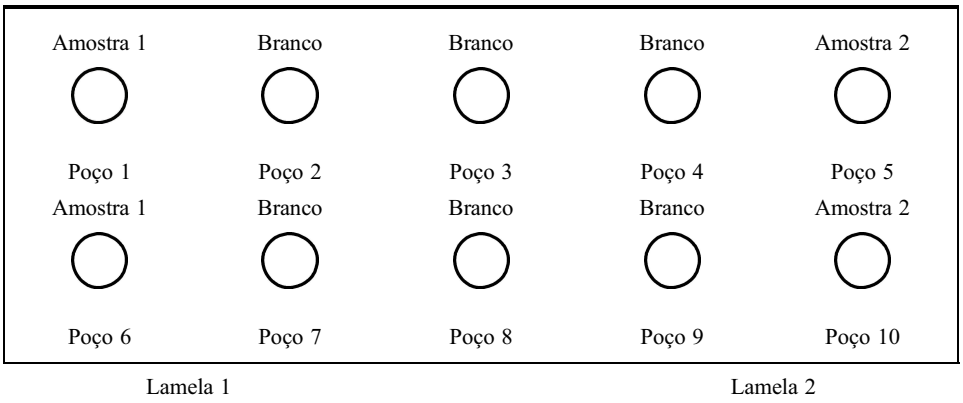
Etanol a 96 % constitui um fixador alternativo. Para o utilizar, dissolver o sedimento referido em 5.1.2 em 50 µl de tampão fosfato 0,01M e 50 µl de etanol a 96 %. Agitar em vórtice e incubar a 4 °C durante 30 a 60 minutos.

5.1.4. Centrifugar durante 8 minutos a 7 000 g, remover o sobrenadante e ressuspender o sedimento em 75 µl de tampão fosfato 0,01M (ver apêndice 3).

5.1.5. Colocar 16 µl das suspensões fixadas numa lâmina multiteste limpa, tal como demonstrado na figura 3. Aplicar duas amostras não diluídas diferentes por lâmina e utilizar 10 µl para obter uma diluição de 1:100 (em tampão fosfato 0,01 M). A solução de amostra restante (49 µl) pode ser armazenada a –20 °C após adição de 1 volume de etanol a 96 %. Caso o teste FISH exija uma repetição, remover o etanol por centrifugação e adicionar igual volume de tampão fosfato 0,01 M (agitar em vórtice).

▼**M1**

Figura 3. Configuração para a lâmina FISH.



5.1.6. Secar as lâminas ao ar (ou num secador de lâminas a 37º C) e proceder à sua fixação à chama.

Nesta fase o procedimento pode ser interrompido e a hibridação continuada no dia seguinte. As lâminas devem ser armazenadas em local sem poeiras e seco à temperatura ambiente.

5.2. **Pré-hibridação e hibridação**

5.2.1. Preparar uma solução de lisozima contendo 10 mg de lisozima (Sigma L-6876) em 10 ml de tampão (Tris-HCl 100 mM, EDTA 50mM, pH 8,0). Esta solução pode ser armazenada mas deverá ser congelada/ /descongelada apenas uma vez. Cobrir cada poço de amostra com cerca de 50 µl de solução de lisozima e incubar durante 10 minutos à temperatura ambiente. Mergulhar então as lâminas em água desmineralizada apenas uma vez e secar com papel de filtro.

Alternativamente, em vez de lisozima, adicionar 50 µl de uma solução de proteinase K 40-400 µl ml^{-1} em tampão (Tris HCl 20 mM, $CaCl_2$ 2mM, pH 7,4) a cada poço e incubar a 37 °C durante 30 minutos.

5.2.2. Desidratar as células num gradiente de concentrações de etanol de 50 %, 80 % e 96 % durante 1 minuto cada. Secar as lâminas ao ar num porta-lâminas.

5.2.3. Preparar uma câmara de incubação húmida, cobrindo o fundo de uma caixa hermética com papel absorvente ou de filtro embebido em 1x «hybmix» (apêndice 7). Pré-incubar a caixa na estufa de hibridação a 55 °C durante, pelo menos, 10 minutos.

5.2.4. Preparar 45 µl de solução de hibridação (apêndice 7) por lâmina e pré-incubar durante 5 minutos a 55 °C.

5.2.5. Colocar as lâminas sobre uma placa aquecida a 45 °C e aplicar 10 µl de solução de hibridação em cada um dos 4 poços da(s) lâmina(s).

5.2.6. Aplicar duas lamelas (24 x 24 mm) em cada lâmina, sem retenção de ar. Colocar as lâminas na câmara húmida pré-aquecida e hibridar de um dia para o outro na estufa a 55 °C, na obscuridade.

5.2.7. Preparar 3 copos contendo 1 l de água ultra pura (UPW), 1 l de 1x «hybmix» (334 ml de 3x «hybmix» e 666 ml de UPW) e 1 l de 1/2x «hybmix» (167 ml de 3x «hybmix» e 833 ml de UPW). Pré-incubar cada um deles em banho-maria a 55 °C.

5.2.8. Retirar as lamelas das lâminas e colocar estas últimas no porta--lâminas.

5.2.9. Remover as sondas em excesso por incubação durante 15 minutos no recipiente com 1x «hybmix» a 55 °C.

5.2.10. Transferir o porta-lâminas para uma solução de lavagem com 1/2 de «hybmix» e incubar durante mais 15 minutos.

5.2.11. Mergulhar as lâminas brevemente em UPW e colocá-las sobre papel de filtro. Remover o excesso de humidade cobrindo a superfície suavemente com papel de filtro. Pipetar 5-10 µl de solução de montagem que evite uma rápida perda de fluorescência (por exemplo, Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA ou equivalente) em cada poço e aplicar uma lamela grande (24 × 60 mm) cobrindo toda a lâmina.

▼M1

5.3. **Leitura do teste FISH**

5.3.1. Observar imediatamente as lâminas com um microscópio equipado para microscopia de epifluorescência, sob lente de imersão em óleo, a uma ampliação de 630 ou 1 000x. Com um filtro indicado para isotiocianato de fluoresceína (FITC), as células eubacterianas (incluindo a maior parte das células gram-negativas) presentes na amostra mostram uma coloração verde fluorescente. Com um filtro para isotiocianato-5--tetrametilrodamina, as células de *C. m.* subsp. *sepedonicus* coradas com Cy3 revelam-se vermelho fluorescente. Comparar a morfologia das células com a dos controlos positivos. As células devem apresentar-se com uma fluorescência brilhante e completamente coradas. O teste FISH (ponto 9.4) deve ser repetido se a coloração for aberrante. Examinar os poços ao longo de dois diâmetros perpendiculares e à volta do perímetro. Para amostras que não revelem células, ou cujo número seja reduzido, observar, pelo menos, 40 campos do microscópio.

5.3.2. Procurar células fluorescentes brilhantes com a morfologia característica de *C. m.* subsp. *sepedonicus* nos poços das lâminas de teste (ver sítio *web* http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). A intensidade de fluorescência deve ser equivalente ou superior à da estirpe do controlo positivo. As células com coloração incompleta ou com fluorescência fraca não devem ser consideradas.

5.3.3. Caso se suspeite de qualquer contaminação, o teste deve ser repetido. Este poderá ser o caso quando todas as lâminas de um lote revelem células positivas devido à contaminação do tampão ou se forem encontradas células positivas (fora do poço da lâmina) no revestimento da lâmina.

5.3.4. Há vários problemas inerentes à especificidade do teste FISH. Em sedimentos de cones de hilos e de segmentos de caule da batateira, é provável a ocorrência de populações de células fluorescentes com morfologia atípica e reacções cruzadas de bactérias saprófitas com dimensões e morfologia semelhantes a *C. m.* subsp. *sepedonicus*, apesar de este fenómeno ser menos frequente do que no teste IF.

5.3.5. Considerar unicamente as células fluorescentes de dimensões e morfologia típicas, ver em 5.3.2.

5.3.6. Interpretação do resultado do teste FISH

i) Obtêm-se resultados válidos para o teste FISH quando se observarem, com um filtro para FITC, células brilhantes com fluorescência verde de dimensões e morfologia típicas de *C. m.* subsp. *sepedonicus* e, com o filtro para rodamina, células brilhantes com fluorescência vermelha em todos os controlos positivos, as quais deverão estar ausentes em todos os controlos negativos. Se forem detectadas células fluorescentes brilhantes e com a morfologia característica, determinar o número médio de células típicas por cada campo do microscópio e calcular o número de células típicas por ml de sedimento ressuspenso (apêndice 4). As amostras com, pelo menos, 5 x 10^3 células típicas por ml de sedimento ressuspenso são consideradas como potencialmente contaminadas. A realização de outros testes é obrigatória. As amostras com menos de 5 x 10^3 células típicas por ml de sedimento ressuspenso são consideradas negativas.

ii) O teste FISH é negativo se não se observarem, com um filtro para rodamina, células brilhantes com fluorescência vermelha e dimensões e morfologia típicas de *C. m.* subsp. *sepedonicus*, mas sejam observadas células típicas brilhantes com fluorescência vermelha nas preparações de controlo positivo mediante a utilização do filtro para rodamina.

6. PCR

Princípios

Sempre que se utilize a PCR como teste de rastreio principal e o seu resultado seja positivo, terá de se realizar o teste IF como segundo teste obrigatório de rastreio. Sempre que se utilize o teste PCR como segundo teste de rastreio e o seu resultado seja positivo, terão de se realizar mais testes de acordo com o fluxograma para completar o diagnóstico.

A exploração completa deste método como teste de rastreio principal é apenas recomendada quando tenham sido adquiridos conhecimentos altamente especializados.

▼**M1**

Nota:

Os testes preliminares com este método deveriam permitir a detecção reprodutível de 10^3 a 10^4 células de *C. m.* subsp. *sepedonicus* por ml adicionadas a amostras de extractos que apresentaram anteriormente resultados negativos. Poderão ser necessárias experiências de optimização para alcançar os níveis máximos de sensibilidade e especificidade em todos os laboratórios.

Utilizar reagentes e protocolos PCR validados. Seleccionar, de preferência, um método que disponha de um controlo interno.

Tomar as precauções necessárias para evitar a contaminação da amostra com ADN-alvo. O teste PCR deverá ser realizado por técnicos experimentados, em laboratórios dedicados à biologia molecular, no sentido de minimizar a possibilidade de contaminação com ADN-alvo.

Os controlos negativos (para os procedimentos de extracção de ADN e PCR) devem ser sempre manipulados como amostras finais no procedimento, a fim de evidenciar a ocorrência de qualquer contaminação com ADN.

Devem ser incluídos no teste PCR os seguintes controlos negativos:

— Extracto de amostra que tenha anteriormente sido testado e se tenha revelado negativo relativamente à presença de *C. m.* subsp. *sepedonicus*;

— Controlos dos tampões utilizados para extrair a bactéria e o ADN da amostra;

— Mistura de reacção da PCR.

Devem ser incluídos os seguintes controlos positivos:

— Alíquotas de sedimentos ressuspensos às quais se adicionou *C. m.* subsp. *sepedonicus* (ver preparação no apêndice 2);

— Uma suspensão em água contendo10^6 células por ml de um isolado virulento (por exemplo, NCPPB 2140 ou NCPPB 4053) de *C. m.* subsp. *sepedonicus*;

— Se possível, utilizar também ADN extraído de amostras de controlo positivas no teste PCR.

Para evitar uma potencial contaminação, os controlos positivos deverão ser preparados num ambiente separado do das amostras a serem testadas.

Os extractos de amostras devem estar, o mais possível, isentas de terra. Seria, por isso, em alguns casos, mais prudente preparar as extracções a partir de batatas lavadas, caso se utilizem os testes PCR.

6.1. **Métodos de purificação do ADN**

Utilizar amostras de controlo positivo e negativo, tal como descrito anteriormente.

Preparar o material de controlo de forma idêntica à da(s) amostra(s).

Existe uma variedade de métodos para a purificação do ADN-alvo a partir de amostras de substratos complexos, removendo, deste modo, os inibidores da PCR e outras reacções enzimáticas e concentrando o ADN-alvo no extracto de amostra.

O método seguinte foi optimizado para utilização com o teste PCR validado, referido no apêndice 6.

6.1.(a) Método segundo Pastrick (2000):

1. Pipetar 220 µl de tampão de lise (NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM [pH 8,0], EDTA 1 mM [pH 8,0]) para um tubo Eppendorf de 1,5 ml.
2. Adicionar 100 µl de extracto de amostra e colocar num bloco de aquecimento ou em banho-maria a 95 °C durante 10 minutos.
3. Colocar o tubo em gelo durante 5 minutos.
4. Adicionar 80 µl de solução concentrada de lisozima (50 mg de lisozima por ml em Tris HCl 10 mM, pH 8,0) e incubar a 37 °C durante 30 minutos.
5. Adicionar 220 µl de solução A Easy DNA® (Invitrogen), misturar bem em vórtice e incubar a 65 °C durante 30 minutos.

▼M1

6. Adicionar 100 µl de solução B Easy DNA® (Invitrogen), agitar vigorosamente em vórtice até que o precipitado se desloque livremente no tubo e a amostra esteja uniformemente viscosa.
7. Adicionar 500 µl de clorofórmio e agitar em vórtice até que a viscosidade diminua e a mistura se torne homogénea.
8. Centrifugar a 15 000 g durante 20 minutos a 4 °C para separar as fases e formar a interfase.
9. Transferir a fase superior para um tubo Eppendorf limpo.
10. Adicionar 1 ml de etanol a 100 % (—20 °C) agitar brevemente em vórtice e incubar no gelo durante 10 minutos.
11. Centrifugar a 15 000 g durante 20 minutos a 4 °C e remover o etanol do sedimento.
12. Adicionar 500 µl de etanol a 80 % (—20 °C) e misturar invertendo o tubo.
13. Centrifugar a 15 000 g durante 10 minutos a 4 °C, guardar o sedimento e remover o etanol.
14. Deixar secar o sedimento ao ar ou em «DNA *speed vac*».
15. Ressuspender o sedimento em 100 µl de UPW esterilizada e deixar à temperatura ambiente durante, pelo menos, 20 minutos.
16. Armazenar a —20 °C até ser necessário para a realização da PCR.
17. Centrifugar qualquer precipitado branco até que este se deposite no fundo e utilizar 5 µl do sobrenadante contendo ADN para a PCR.

6.1.(b) Outros métodos

Podem ser aplicados outros métodos de extracção de ADN (por exemplo, Qiagen DNeasy Plant Kit), desde que esteja provado que são igualmente eficazes na purificação do ADN a partir de amostras de controlo contendo 10^3 a 10^4 células do patogéneo por ml.

6.2. **PCR**

6.2.1. Preparar as amostras a testar e controlos para a PCR em conformidade com o protocolo validado (apêndice 6). Preparar uma diluição decimal de extracto de ADN da amostra (1:10 em UPW).

6.2.2. Preparar a mistura adequada de reacção da PCR num ambiente isento de contaminação, de acordo com o protocolo publicado (apêndice 6). O protocolo da PCR validado é uma reacção multiplex que incorpora também um controlo interno da PCR.

6.2.3. Adicionar 5 µl de extracto de ADN à mistura de reacção da PCR de forma a obter um volume final de 25 µl em tubos PCR esterilizados.

6.2.4. Incorporar uma amostra de controlo negativo contendo apenas a mistura de reacção da PCR e adicionar a mesma fonte de UPW utilizada na mistura da PCR em substituição da amostra.

6.2.5. Colocar os tubos no mesmo termociclador que foi utilizado no teste preliminar e iniciar o programa optimizado da PCR adequado (apêndice 6).

6.3. **Análise do produto da PCR**

6.3.1. Proceder à electroforese em gel de agarose dos fragmentos amplificados pela PCR. Correr, pelo menos, 12 µl de mistura de reacção contendo o ADN amplificado de cada uma das amostras, misturados com 3 µl de tampão de carregamento (apêndice 6), em géis de agarose a 2 % (p/v) em tampão de tris acetato-EDTA (TAE) (apêndice 6) a 5-8 V por cm. Utilizar um marcador de ADN adequado, por exemplo 100 bp DNA *ladder*.

6.3.2. Revelar as bandas de ADN através de coloração em brometo de etídio (0,5 mg por l) durante 30-45 minutos, tomando as precauções adequadas para manusear este agente mutagénico.

6.3.3. Observar o gel corado num transiluminador com UV de ondas curtas (por exemplo, $\lambda = 302$ nm) para detecção de produtos amplificados da PCR de tamanho esperado (apêndice 6) e documentar.

6.3.4. Para todas as novas detecções/situações, verificar a autenticidade do fragmento amplificado pela PCR através da realização de análise de restrição enzimática na amostra do ADN amplificado restante, por incubação com uma enzima de restrição e um tampão adequados à temperatura e com duração óptimas (apêndice 6). Proceder em

▼M1

seguida, tal como anteriormente, à electroforese em gel de agarose dos fragmentos digeridos e observar o padrão dos fragmentos de restrição característico num transiluminador com UV, após coloração com brometo de etídio, e comparar com o controlo positivo não digerido e digerido.

Interpretação do resultado do teste PCR

O teste PCR é considerado negativo caso não seja detectado o fragmento amplificado pela PCR de tamanho específico esperado para *C. m.* subsp. *sepedonicus* para a amostra em estudo, mas seja detectado em todas as amostras de controlo positivo (no caso da PCR multiplex com iniciadores de controlo interno específicos para as plantas, deverá ser detectado um segundo produto da PCR de tamanho esperado na amostra em estudo).

O teste PCR é considerado positivo caso seja detectado o fragmento amplificado pela PCR específico para *C. m.* subsp. *sepedonicus* de tamanho e padrão de restrição esperados (quando necessário), desde que não seja amplificado a partir de nenhuma das amostras de controlo negativo. A confirmação fiável de um resultado positivo pode também ser obtida mediante a repetição do teste com um segundo conjunto de iniciadores da PCR (secção 9.3).

Nota:

Pode suspeitar-se de inibição da PCR se o fragmento amplificado esperado for observado na amostra de controlo positivo de uma suspenção aquosa de *C. m.* subsp. *sepedonicus*, mas se obtenham resultados negativos de controlos positivos de *C. m.* subsp. *sepedonicus* em extracto de batata. Nos protocolos da PCR multiplex com controlos internos da PCR, a inibição da reacção é indicada sempre que não se obtenha nenhum dos dois fragmentos amplificados.

Pode suspeitar-se de contaminação, caso o fragmento amplificado esperado seja obtido em um ou vários dos controlos negativos.

7. BIOENSAIO

Nota:

Um teste preliminar com este método deveria permitir a detecção reprodutível de 10^3 a 10^4 unidades formadoras de colónias de *C. m.* subsp. *sepedonicus* por ml adicionadas a amostras de extractos para os quais se obtiveram anteriormente resultados negativos (para a preparação ver apêndice 2).

A mais elevada sensibilidade de detecção pode ser esperada quando se utiliza uma amostra de extracto recentemente preparada e condições de crescimento óptimas. No entanto, o método pode ser aplicado com sucesso a extractos que tenham sido armazenados em glicerol a uma temperatura compreendida entre –68 e –86 °C.

Algumas variedades de beringelas constituem um excelente meio de enriquecimento selectivo para o crescimento de *C. m.* subsp. *sepedonicus*, mesmo na ausência de sintomas, proporcionando também um excelente teste de patogenicidade para confirmação da identificação da bactéria.

As condições de cultivo devem ser óptimas para reduzir o risco de falsos resultados negativos.

Para os pormenores das condições de cultivo, ver apêndice 8.

7.1. Distribuir toda a alíquota restante do sedimento ressuspenso descrito nos pontos 3.1.6 ou 3.2.5 pelas beringelas através de um dos métodos a seguir referidos (7.3 ou 7.4). Utilizar apenas plantas que se encontrem no estádio fenológico de 2-3 folhas, até à expansão total da terceira folha verdadeira. De forma a assegurar a completa utilização do sedimento ressuspenso bem como uma inoculação eficaz, os procedimentos a seguir mencionados irão requerer a inoculação de 15-25 plantas de beringela por amostra.

7.2. Não regar as beringelas 1 a 2 dias antes da inoculação para reduzir a sua turgescência.

7.3. Inoculação por fenda

7.3.1 Segurar a planta entre dois dedos, pipetar uma gota (cerca de 5-10 µl) do sedimento ressuspenso no caule, entre os cotilédones e a primeira folha.

▼M1

7.3.2 Utilizando um escalpelo esterilizado, fazer uma fenda em diagonal com 1,0 cm de comprimento e com uma profundidade de cerca de 2/3 do diâmetro do caule, começando a incisão a partir da gota de sedimento.

7.3.3 Selar o corte com vaselina esterilizada aplicada com uma seringa.

7.4. Inoculação por injecção

Inocular os caules das beringelas imediatamente acima dos cotilédones, utilizando uma seringa com uma agulha hipodérmica (não inferior a 23 G). Distribuir o sedimento pelas beringelas.

7.5. Como controlos positivos, inocular 5 plantas com uma suspensão aquosa de 10^5 a 10^6 células por ml de uma cultura conhecida de *C. m.* subsp. *sepedonicus* e, sempre que possível, com tecido de um tubérculo naturalmente infectado (ver secção 4) através da mesma técnica de inoculação (7.3 ou 7.4).

7.6. Como controlos negativos, inocular 5 plantas com tampão de ressuspensão esterilizado, seguindo a mesma técnica de inoculação (7.3 ou 7.4).

7.7. Incubar as plantas em instalações de quarentena durante um período de até 4 semanas a uma temperatura compreendida entre 18 e 24 °C. Incubar as plantas com luz suficiente e uma elevada humidade relativa (70-80 %), regando adequadamente de modo a evitar o alagamento ou a murchidão por falta de água. As células de *C. m.* subsp. *sepedonicus* não resistem a temperaturas superiores a 30 °C e a temperatura óptima é de 21 °C. Para evitar contaminações, incubar as plantas de controlo positivo e as de controlo negativo em bancadas claramente separadas, numa estufa ou câmara de crescimento ou, mesmo que existam limitações de espaço, garantir uma separação rigorosa entre tratamentos. Se as plantas relativas a amostras diferentes tiverem de ser incubadas perto umas das outras, separá-las com as divisórias adequadas. Tomar sempre todas as precauções de forma a evitar contaminações cruzadas ao adubar, regar, inspeccionar ou ao efectuar outras manipulações. É essencial manter as estufas ou as câmaras de crescimento isentas de praga, visto que estas podem transmitir a bactéria entre as amostras.

7.8. Ao fim de uma semana, examinar regularmente as plantas para detectar quaisquer sintomas. Contar o número de plantas que apresentam sintomas. *C. m.* subsp. *sepedonicus* causa murchidão das folhas da beringela, que pode começar sob a forma de flacidez das margens ou entre as nervuras. O tecido murcho pode inicialmente apresentar-se verde-escuro ou manchado, tornando-se em seguida mais pálido antes de ficar necrótico. A murchidão entre as nervuras apresenta frequentemente um aspecto hidrópico. O tecido necrosado apresenta muitas vezes margens de um amarelo vivo. As plantas não morrem forçosamente; quanto mais longo for o período antes do aparecimento dos sintomas, maior é a probabilidade de sobrevivência. As plantas podem sobreviver à infecção. As beringelas jovens são muito mais susceptíveis a baixos níveis populacionais de *C. m.* subsp. *sepedonicus* do que as plantas mais velhas, pelo que é necessário utilizar plantas no estádio fenológico de três folhas ou imediatamente anterior.

A murchidão pode também ser induzida por populações de outras bactérias ou fungos presentes no sedimento do tecido do tubérculo. Incluem-se *Ralstonia solanacearum, Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* e *E. carotovora* subsp. *atroseptica, Erwinia chrysanthemi, Phoma exigua* var. *foveata*, assim como elevadas populações de bactérias saprófitas. Em particular, *Erwinia chrysanthemi* pode provocar sintomas nas folhas e murchidão que se assemelham bastante aos sintomas provocados por *C. m.* subsp. *sepedonicus*. A única diferença é o escurecimento dos caules no caso das infecções por *Erwinia chrysanthemi*. Outras murchidões podem distinguir-se da causada por *C. m.* subsp. *sepedonicus* porque as folhas inteiras, ou a planta inteira, murcham rapidamente. Pode também realizar-se uma coloração de Gram: este teste diferenciará a *C. m.* subsp. *sepedonicus* da *Erwinia* spp.

7.9. Logo que se observem sintomas nas beringelas, deverá efectuar-se o re-isolamento, utilizando-se secções de tecido foliar exibindo murchidão ou do caule das plantas (ver 3.1.3 para a maceração do tecido). Desinfectar a superfície das folhas e caules das beringelas passando-os por etanol a 70 %. Efectuar um teste IF ou PCR da seiva da beringela e isolar em meios (selectivos) adequados (ver secção 8).

▼M1

Pode também ser realizada uma coloração de Gram (apêndice 9). Identificar culturas puras de presumíveis isolados de *C. m.* subsp. *sepedonicus* e confirmar a sua patogenicidade (ver secções 9 e 10).

7.10. Em certas circunstâncias, especialmente quando as condições de cultivo não são as óptimas, é possível que *C. m.* subsp. *sepedonicus* esteja presente nas beringelas embora sob a forma de infecção latente, mesmo depois de períodos de incubação de até 4 semanas. Caso não se observem sintomas após 4 semanas, efectuar o teste IF ou PCR numa amostra composta de secções do caule com 1 cm de cada uma das plantas inoculadas, colhidas acima do local da inoculação. Se os resultados do teste forem positivos, deverá efectuar-se o re-isolamento em meios adequados (selectivos), de acordo com o procedimento referido na secção 8. Identificar culturas puras de presumíveis isolados de *C. m.* subsp. *sepedonicus* e confirmar a sua patogenicidade (secções 9 e 10).

Interpretação do resultado do bioensaio

Obtêm-se resultados válidos no bioensaio quando as plantas do controlo positivo revelam sintomas típicos, é possível isolar a bactéria a partir destas plantas e não se observam sintomas nos controlos negativos.

O bioensaio é negativo se as plantas inoculadas com os extractos das amostras não estiverem infectadas por *C. m.* subsp. *sepedonicus* e se se detectar *C. m.* subsp. *sepedonicus* nos controlos positivos.

O bioensaio é positivo se as plantas inoculadas com os extractos das amostras estiverem infectadas por *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

8. ISOLAMENTO DE *C. M.* SUBSP. *SEPEDONICUS*

Nota:

O diagnóstico apenas está completo se se isolar *C. m.* subsp. *sepedonicus*, se esta bactéria for subsequentemente identificada (ver secção 9) e confirmada a sua identificação por um teste de patogenicidade (secção 10). Embora *C. m.* subsp. *sepedonicus* seja um organismo difícil de cultivar, pode ser isolado a partir de tecidos sintomáticos.

No entanto, como as bactérias saprófitas podem crescer mais rapidamente, é difícil isolar o patogéneo directamente a partir do sedimento obtido a partir dos sedimentos ressuspensos dos tecidos dos tubérculos ou plantas de batateira (pontos 3.1.6 ou 3.2.5). O isolamento directo de *C. m.* subsp. *sepedonicus* pode, contudo, ser possível com um meio selectivo e uma diluição adequada do sedimento ressuspenso dos hilos ou dos caules de batateiras.

Devem ser efectuados isolamentos de todos os tubérculos ou segmentos de caule de batateira que apresentem sintomas típicos, bem como de beringelas inoculadas que, muito embora possam não ter manifestado sintomas, se revelem positivas no teste IF/PCR realizado sobre amostras compostas (ver ponto 7.10). A maceração dos caules de beringela, quando necessária, deve ser efectuada tal como descrito no ponto 3.1.3.

Como controlos positivos, preparar diluições decimais de uma suspensão de 10^6 ufc por ml de *C. m.* subsp. *sepedonicus* (por exemplo, NCPPB 4053 ou PD 406). Para evitar qualquer possibilidade de contaminação, os controlos positivos deverão ser preparados totalmente à parte das amostras a testar.

A boa qualidade de cada novo lote de meio selectivo para o crescimento do patogéneo deve ser testada antes da sua utilização para análise de amostras de rotina.

Testar o material de controlo de forma idêntica à da(s) amostra(s).

8.1. **Diluição em placas com meio selectivo**

8.1.1. A partir de uma alíquota de 100 µl de uma amostra de sedimento ressuspenso de batateira ou de seiva de beringela, efectuar diluições decimais em tampão de ressuspensão (apêndice 3).

8.1.2. O isolamento a partir de sedimento ressuspenso de batateira não diluído é frequentemente infrutífero em consequência da lentidão do crescimento de Cms e da competição de organismos saprófitas. Contudo, visto que as populações da bactéria presentes nos tecidos infectados são habitualmente elevadas, os organismos saprófitas podem geralmente ser eliminados por diluição, enquanto que o patogéneo permanece. Assim, recomenda-se o espalhamento de 100 µl de cada uma das amostras em estudo, diluições 1/100 a 1/10 000, nos

▼M1

meios MTNA ou NCP-88 (apêndice 5) (caso se utilizem placas de Petri de 90 mm de diâmetro; para outros diâmetros de placa, ajustar o volume), com recurso a varetas em L e à técnica de diluição em placa.

Nota:

Uma estratégia alternativa consiste em espalhar os 100 µl de alíquota inicial de sedimento ressuspenso de batateira numa primeira placa de agar com uma vareta em L, utilizar a mesma vareta para espalhar numa segunda placa de agar qualquer resíduo que tenha ficado na vareta e, por fim, repetir este procedimento para uma terceira placa, conseguindo assim um efeito de diluição em placas através da vareta.

8.1.3. Incubar as placas na obscuridade a uma temperatura compreendida entre 21 e 23 °C.

8.1.4. No decurso das observações iniciais das placas, e tendo como referência as placas de controlo positivo, procede-se à contagem de colónias semelhantes às de *C. m.* subsp. *sepedonicus*. Estas observações efectuam-se ao fim de 3 dias, realizando-se novas contagens após 5, 7 e, eventualmente, 10 dias.

8.2. **Purificação de colónias suspeitas**

Nota:

A subcultura de colónias semelhantes a *C. m.* subsp. *sepedonicus* deve ser efectuada em meio YGM para posterior inoculação em beringelas e/ou subsequente identificação; este processo deve realizar-se antes que o crescimento bacteriano seja demasiado, ou seja, ao fim de 3-5 dias.

8.2.1. Fazer um reticulado a partir das colónias com uma morfologia semelhante à de *C. m.* subsp. *sepedonicus* num dos seguintes meios (as suas composições são apresentadas no apêndice 5):

Agar nutritivo com dextrose (só para utilização em subcultura);

Agar com peptona, levedura e glucose;

Agar com extracto de levedura e sais minerais.

Incubar a uma temperatura compreendida entre 21 e 24 °C durante, no máximo, 10 dias.

C. m. subsp. *sepedonicus* cresce lentamente e, após 10 dias de incubação, produz normalmente colónias pontiformes, cremes e convexas (ver imagens de colónias típicas de *C. m.* subsp. *sepedonicus* no sítio *web* http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

8.2.2. Voltar a fazer um reticulado para confirmar a pureza do isolado.

As taxas de crescimento melhoram com uma subcultura. As colónias típicas são creme-esbranquiçadas ou cor de marfim, ocasionalmente amarelas, arredondadas, lisas, convexas, com um aspecto mucóide--fluido, com margens inteiras e, normalmente, com 1 a 3 mm de diâmetro.

Uma simples coloração de Gram (apêndice 9) pode ajudar a seleccionar as colónias a submeter a outros testes.

8.2.3. Identificar culturas de presumíveis isolados de *C. m.* subsp. *sepedonicus* (ver secção 9) e efectuar um teste de patogenicidade (ver secção 10).

9. IDENTIFICAÇÃO

Identificar culturas puras de presumíveis isolados de *C. m.* subsp. *sepedonicus*, utilizando, pelo menos, dois dos seguintes testes baseados em princípios biológicos diferentes.

Incluir estirpes de referência conhecidas, sempre que adequado, para cada teste realizado.

9.1. **Testes nutricionais e enzimáticos de identificação**

Determinar as seguintes características fenotípicas que estão universalmente presentes ou ausentes em *C. m.* subsp. *sepedonicus*, de acordo com os métodos descritos por Lelliott e Stead (1987), Klement *et al.* (1990), Schaad (2001), Anónimo (1987).

Todos os meios devem ser incubados a 21 °C e examinados ao fim de seis dias. Se não houver crescimento, incubar, no máximo, 20 dias.

▼M1

Todos os testes devem incluir um controlo com uma estirpe conhecida de *C. m.* subsp. *sepedonicus*. Todos os testes nutricionais e fisiológicos têm de ser feitos utilizando inóculos a partir de subculturas em agar nutritivo. As comparações morfológicas devem ser feitas em culturas em agar nutritivo com dextrose.

Testes	*Resultado esperado*
Teste de oxidação/fermentação (O/F)	Inerte ou fracamente oxidativa
Produção de oxidase	–
Crescimento a 37 °C	–
Produção de urease	–
Hidrólise da esculina	+
Hidrólise do amido	– ou fraca
Tolerância a NaCl a 7 %	–
Produção de indole	–
Produção de catalase	+
Produção de H_2S	–
Utilização de citrato	–
Liquefacção da gelatina	–
Produção de ácido a partir de glicerol	–
Produção de ácido a partir de lactose	– ou fraca
Produção de ácido a partir de ramnose	–
Produção de ácido a partir de salicina	–
Coloração de Gram (apêndice 9)	+

9.2. **TESTE IF**

a) Preparar uma suspensão com cerca de 10^6 células por ml em tampão IF (apêndice 3).

b) Preparar uma série de diluições a 1/2 de um anti-soro adequado.

c) Aplicar o procedimento de IF (secção 4).

d) Um resultado positivo ao teste IF é alcançado se o título IF da cultura for equivalente ao do controlo positivo.

9.3. **Teste PCR**

a) Preparar uma suspensão com cerca de 10^6 células por ml em água ultra pura (UPW).

b) Aquecer 100 µl da suspensão de células em tubos fechados num bloco de aquecimento ou em banho-maria a 100 °C durante 4 minutos. Se necessário, a adição de hidróxido de sódio recentemente preparado com uma concentração final de 0,05M pode auxiliar a lise das células. As amostras podem, então, ser armazenadas a uma temperatura compreendida entre –16 e –24 °C até serem necessárias.

c) Aplicar os procedimentos da PCR adequados para assim se obterem os fragmentos amplificados específicos de *C. m.* subsp. *sepedonicus* (por exemplo, Pastrick, 2000; ver apêndice 4; Li e de Boer, 1995; Mills *et al.*, 1997; Pastrik e Rainey, 1999; Schaad *et al.*, 1999).

d) É alcançada uma identificação positiva de *C. m.* subsp. *sepedonicus* se os fragmentos amplificados pela PCR tiverem o mesmo tamanho e padrão de restrição que a estirpe de controlo positivo.

9.4. **Teste FISH**

a) Preparar uma suspensão com cerca de 10^6 células por ml em UPW.

b) Aplicar o procedimento FISH (secção 5).

c) Um resultado positivo no teste FISH é alcançado se o controlo positivo apresentar as mesmas reacções do isolado em estudo.

▼M1

9.5. **Perfis de ácidos gordos (FAP)**

a) Incubar o isolado em agar de soja e tripticase (Oxoid) durante 72 horas a 21 °C (+/– 1 °C).

b) Utilizar um procedimento FAP adequado (Janse, 1991; Stead, 1992).

c) Um resultado positivo no teste FAP é alcançado se o perfil do isolado em estudo for idêntico ao do controlo positivo. A presença de ácidos gordos característicos 15:1 Anteiso A, 15:0 Iso, 15:0 Anteiso, 16:0 Iso, 16:0 e 17:0 Anteiso é altamente indicativa de *C. m.* subsp. *sepedonicus*. Outros géneros como *Curtobacterium, Arthrobacter* e *Micrococcus* também têm alguns destes ácidos mas o 15:1 Anteiso A é um ácido raro nestas bactérias que ocorre, no entanto, em todos os *Clavibacter* spp. com um valor entre 1 e 5 %. Para *C. m.* subsp. *sepedonicus* o valor é, normalmente, de cerca de 5 %.

9.6. **BOX-PCR**

a) Preparar uma suspensão com cerca de 10^6 células por ml em UPW.

b) Aplicar o teste de acordo com o procedimento descrito por Smith *et al.*, (2001).

10. TESTE DE CONFIRMAÇÃO

O teste de patogenicidade tem de ser efectuado como confirmação final do diagnóstico de *C. m.* subsp. *sepedonicus* e para avaliar a virulência dos isolados identificados como *C. m.* subsp. *Sepedonicus*:

10.1. Preparar um inóculo de aproximadamente 10^6 células por ml de culturas com 3 dias do isolado em estudo e de uma estirpe de *C. m.* subsp. *sepedonicus* adequada para controlo positivo.

10.2. Inocular 5-10 caules de beringelas provenientes de plântulas no estádio fenológico de 3 folhas verdadeiras (pontos 7.3 ou 7.4).

10.3. Incubar a uma temperatura compreendida entre 18 e 24 °C com luz suficiente e uma humidade relativa elevada, regando adequadamente para evitar o alagamento ou a seca (ponto 7.7). Com culturas puras deve observar-se a murchidão típica no período de 2 semanas, mas as plantas que não apresentem sintomas (ver ponto 7.8) ao fim desse período, devem ser incubadas até à 3.ª semana, a uma temperatura que favoreça o crescimento da beringela, mas não devendo exceder os 25 ° C (apêndice 8). Se ao fim de 3 semanas não se observarem quaisquer sintomas, não se pode confirmar que o isolado seja uma forma patogénica de *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

10.4. Efectuar um isolamento a partir das plantas com sintomas, retirando-lhes uma secção de 2 cm de caule acima do ponto de inoculação. Fragmentá-las e suspendê-las num pequeno volume de água destilada esterilizada ou de tampão fosfato 50 mM (apêndice 3). Isolar a partir de diluições apropriadas da suspensão por espalhamento ou reticulado em MTNA e YPGA (apêndice 5), incubar durante 3-5 dias a uma temperatura compreendida entre 21 e 23 °C e observar a formação de colónias típicas de *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

▼**M1**

Apêndice 1

Laboratórios envolvidos na optimização e na validação de protocolos

Laboratório ([1])	Localização	País
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Viena e Linz	Áustria
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Bélgica
Plantedirektoratet	Lyngby	Dinamarca
Central Science Laboratory	York	Inglaterra
Scottish Agricultural Science Agency	Edimburgo	Escócia
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	França
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	França
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Alemanha
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Alemanha
State Laboratory	Dublin	Irlanda
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Países Baixos
Norwegian Crop Research Institute, Plant Protection Centre	Aas	Noruega
Direcção-Geral de Protecção das Culturas (DGPC)	Lisboa	Portugal
Nacionalni institut za biologijo	Liubliana	Eslovénia
Centro de Diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	Espanha

([1]) Cientistas de contacto: ver sítio *web* http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

▼M1

Apêndice 2

Preparação de controlos positivos e negativos para os testes essenciais de rastreio PCR/IF e FISH

Preparar uma suspensão a partir do crescimento em meio basal MTNA de uma cultura com 72 horas de uma estirpe virulenta de *C. m.* subsp. *sepedonicus* [NCPPB 4053 ou PD 406], em tampão fosfato 10 mM, por forma a obter uma concentração de, aproximadamente, 1 a 2×10^8 ufc por ml. Esta é obtida, normalmente, com uma suspensão ligeiramente turva, equivalente a uma densidade óptica de 0,20 a 600 nm.

Remover os cones dos hilos de 200 tubérculos colhidos de uma variedade de epiderme branca isenta de *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

Processar os hilos como habitualmente e ressuspender o sedimento em 10 ml.

Preparar 10 microtubos esterilizados de 1,5 ml com 900 µl de sedimento ressuspenso.

Transferir 100 µl da suspensão de *C. m.* subsp. *sepedonicus* para o primeiro microtubo. Agitar em vórtice.

Utilizar os cinco microtubos seguintes para efectuar uma série de cinco diluições decimais.

Os seis microtubos assim contaminados serão utilizados como controlos positivos. Os quatro microtubos não contaminados serão utilizados como controlos negativos. Rotular os microtubos em conformidade.

Preparar alíquotas de 100 µl em microtubos esterilizados de 1,5 ml, obtendo assim nove réplicas de cada amostra de controlo. Armazenar a uma temperatura compreendida entre –16 e –24 °C até à sua utilização.

A presença e a quantificação de *C. m.* subsp. *sepedonicus* nas amostras de controlo deverão ser primeiro confirmadas por IF.

Para o teste PCR, efectuar a extracção de ADN das amostras de controlo positivo e negativo para cada série de amostras a testar.

Para os testes IF e FISH efectuar ensaios nas amostras de controlo positivas e negativas para cada série de amostras a testar.

Para os testes IF, FISH e PCR, deverá detectar-se *C. m.* subsp. *sepedonicus*, pelo menos, nas amostras de controlo positivo com 10^6 e 10^4 células por ml e esta bactéria não deverá ser detectada em nenhum controlo negativo.

▼M1

Apêndice 3

Tampões para a realização dos testes

GERAL: Os tampões esterilizados não abertos podem ser armazenados durante 1 ano.

1. **Tampões para extracção**

1.1. *Tampão de extracção (tampão fosfato 50 mM, pH 7,0)*

Este tampão é utilizado para a extracção da bactéria dos tecidos vegetais por homogeneização ou agitação.

Na_2HPO_4 (anidro)	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
Água destilada	1,00 l

Dissolver os ingredientes, verificar o pH e esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Os seguintes componentes adicionais podem também ser úteis:

	Finalidade	Quantidade (por l)
Flocos de Lubrol	Antifloculante (*)	0,5 g
Antiespuma DC silicone	Antiespumante (*)	1,0 ml
Pirofosfato tetrassódico	Antioxidante	1,0 g
Polivinilpirrolidona-40 000 (PVP-40)	Complexante de inibidores da PCR	50 g

(*) Para utilização com o método de extracção por homogeneização.

1.2. *Tampão de ressuspensão (tampão fosfato 10 mM, pH 7,2)*

Este tampão é utilizado para a ressuspensão e diluição dos extractos dos cones dos hilos dos tubérculos de batateira, após a sua concentração por centrifugação.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,4 g
Água destilada	1,00 l

Dissolver os ingredientes, verificar o pH e esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

2. **Tampões para o teste IF**

2.1. *Tampão IF (tampão fosfato salino (PBS) 10 mM, pH 7,2)*

Este tampão é utilizado para a diluição dos anticorpos.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,4 g
NaCl	8,0 g
Água destilada	1,0 l

Dissolver os ingredientes, verificar o pH e esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

2.2. *Tampão IF-Tween*

Este tampão é utilizado para a lavagem das lâminas.

Adicionar 0,1 % de Tween 20 ao tampão IF.

2.3. *Tampão fosfato com glicerol, pH 7,6*

Este tampão é utilizado como fluido de montagem nos poços das lâminas de IF para aumentar a fluorescência.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	3,2 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,15 g
Glicerol	50 ml
Água destilada	100 ml

▼**M1**

Estão comercialmente disponíveis soluções de montagem para evitar a rápida perda de fluorescência como sejam, por exemplo Vectashield® (Vector Laboratories) ou Citifluor® (Leica).

▼M1

Apêndice 4

Determinação do nível de contaminação nos testes IF e FISH

1. Determinar o número médio de células fluorescentes típicas por campo de observação (c).
2. Calcular o número de células fluorescentes típicas por poço de lâmina de microscópio (C).

   $C = c \times S/s$

   Em que S = área da superfície de cada poço da lâmina de poços múltiplos, e

   s = área da superfície do campo da objectiva

   $s = \pi i^2/4G^2K^2$ em que i = coeficiente de campo (varia entre 8 e 24, dependendo do tipo de ocular)

   K = coeficiente do tubo (1 ou 1,25)

   G = ampliação da objectiva (l00x, 40x, etc.)

3. Calcular o número de células fluorescentes típicas por ml de sedimento ressuspenso (N)

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

   em que y = volume de sedimento ressuspenso em cada poço, e

   F = factor de diluição do sedimento ressuspenso

▼M1

Apêndice 5

Meio de isolamento e cultura de *C. m.* **subsp.** *sepedonicus*

a) *Meios gerais de crescimento*

Agar nutritivo (NA)

Agar nutritivo (Difco)	23,0 g
Água destilada	1,0 l

Dissolver os ingredientes e esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Agar nutritivo com dextrose (NDA)

Bacto-Agar nutritivo da Difco com 1 % de D(+)glucose mono-hidratada. Esterilizar em autoclave a 115 °C durante 20 minutos

Agar com extracto de levedura, peptona e glucose (YPGA)

Extracto de levedura (Difco)	5,0 g
Bacto-Peptona (Difco)	5,0 g
D(+)glucose mono-hidratada	10,0 g
Bacto-Agar (Difco)	15,0 g
Água destilada	1,0 l

Dissolver os ingredientes e esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Extracto de levedura e sais minerais (YGM)

Bacto extracto de levedura (Difco)	2,0 g
D(+)glucose mono-hidratada	2,5 g
K_2HPO_4	0,25 g
KH_2PO_4	0,25 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,1 g
$MnSO_4.\ H_2O$	0,015 g
NaCl	0,05 g
$FeSO_4.7H_2O$	0,005 g
Bacto-Agar (Difco)	18 g
Água destilada	1,0 l

Dissolver os ingredientes e esterilizar volumes de meio litro em autoclave a 115 °C durante 20 minutos.

b) *Meios de crescimento selectivo validados*

Meio MTNA

Excepto quando assinalado em contrário, todos os componentes do meio são da BDH

Extracto de levedura (Difco)	2,0 g
Manitol	2,5 g
K_2HPO_4	0,25 g
KH_2PO_4	0,25 g
NaCl	0,05 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,1 g
$MnSO_4.\ H_2O$	0,015 g
$FeSO_4.7H_2O$	0,005 g
Agar (Oxoid n.º 1)	16,0 g
Água destilada	1,0 l

▼**M1**

Dissolver os ingredientes e ajustar o pH a 7,2. Após autoclavagem (a 121 °C durante 15 minutos) e arrefecimento a 50 °C, adicionar os antibióticos: trimetoprima 0,06 g, ácido nalidíxico 0,002 g e anfotericina B 0,01 g.

Soluções concentradas de antibiótico: trimetoprima (Sigma) e ácido nalidíxico (Sigma) (ambos a 5 mg/ml), em metanol a 96 % e anfotericina B (Sigma) (1 mg/ml) em dimetilsulfóxido. As soluções concentradas são esterilizadas por filtração.

Nota:

A durabilidade do meio basal é de 3 meses. Após a adição dos antibióticos, a durabilidade é de 1 mês quando armazenado refrigerado.

Meio NCP-88

Agar nutritivo (Difco)	23 g
Extracto de levedura (Difco)	2 g
D-manitol	5 g
K_2HPO_4	2 g
KH_2PO_4	0,5 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,25 g
Água destilada	1,0 l

Dissolver os ingredientes e ajustar o pH a 7,2. Após autoclavagem e arrefecimento a 50 °C, adicionar os seguintes antibióticos: sulfato de polimixina B (Sigma) 0,003 g, ácido nalidíxico (Sigma) 0,008 g e cicloheximida (Sigma) 0,2 g.

Dissolver os antibióticos em soluções concentradas da seguinte forma: ácido nalidíxico em NaOH 0,01 M, cicloheximida em etanol a 50 % e sulfato de polimixina B em água destilada. As soluções concentradas são esterilizadas por filtração.

Nota:

A durabilidade do meio basal é de 3 meses. Após a adição dos antibióticos, a durabilidade é de 1 mês quando armazenado refrigerado.

▼**M1**

Apêndice 6

Protocolo e reagentes da PCR validados

Nota:

O teste preliminar deveria permitir a detecção reprodutível de, pelo menos, 10^3 a 10^4 células de *C. m.* subsp. *sepedonicus* por ml de amostra de extractos.

O teste preliminar não deveria ainda revelar nenhum resultado falso positivo com um painel de estirpes bacterianas seleccionadas.

1. **Protocolo PCR Multiplex com controlo interno à PCR (Pastrik, 2000)**

1.1. *Iniciadores*

Iniciador directo PSA-1 5'- ctc ctt gtg ggg tgg gaa aa -3'

Iniciador inverso PSA-R 5'- tac tga gat gtt tca ctt ccc c -3'

Iniciador directo NS-7-F 5'- gag gca ata aca ggt ctg tga tgc -3'

Iniciador inverso NS-8--R 5'- tcc gca ggt tca cct acg ga -3'

Tamanho esperado do fragmento amplificado do ADN-alvo de *C. m.* subsp. *sepedonicus* = 502 bp (conjunto iniciador PSA).

Tamanho esperado do fragmento amplificado do controlo interno da PCR de 18S rRNA = 377 bp (conjunto iniciador NS).

1.2. *Mistura de reacção da PCR*

Reagentes	Volume por reacção	Concentração final
UPW esterilizada	15,725 µl	
Tampão PCR ([1]) 10x ($MgCl_2$ 15 mM)[2]	2,5 µl	1x ($MgCl_2$ 1,5 mM)
BSA (fracção V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
Mistura d-NTP (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Iniciador PSA-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Iniciador PSA-R (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Iniciador NS-7-F (10 µM) ([2])	0,1 µl	0,04 µM
Iniciador NS-8-R (10 µM) ([2])	0,1 µl	0,04 µM
Taq polimerase (5U/µl) ([1])	0,2 µl	1,0 U
Volume da amostra	5,0 µl	
Volume total:	25,0 µl	

([1]) Os métodos foram validados utilizando *Taq* polimerase da Perkin Elmer (AmpliTaq ou Gold) e Gibco BRL.

([2]) A concentração de iniciadores NS-7-F e NS-8-R foi optimizada para a extracção da bactéria a partir dos cones dos hilos dos tubérculos de batateira, utilizando o método de homogeneização bem como o de purificação do ADN de acordo com Pastrik (2000) (ver alínea a) do ponto 6.1 e o ponto 6.2). Será necessária a re-optimização das concentrações do reagente se se utilizar a extracção por agitação ou outros métodos de isolamento do ADN.

1.3. *Condições de reacção da PCR*

Correr o seguinte programa:

1 ciclo de:	i)	3 minutos a uma temperatura de 95 °C (desnaturação do ADN-alvo)
10 ciclos de:	ii)	1 minuto a uma temperatura de 95 ° C (desnaturação do ADN-alvo)
	iii)	1 minuto a uma temperatura de 64 ° C (emparelhamento dos iniciadores)
	iv)	1 minuto a uma temperatura de 72 ° C (extensão da cópia)
25 ciclos de:	v)	30 segundos a uma temperatura de 95 °C (desnaturação do ADN-alvo)
	vi)	30 segundos a uma temperatura de 62 °C (emparelhamento dos iniciadores)

▼M1

	vii)	1 minuto a uma temperatura de 72 ° C (extensão da cópia)
1 ciclo de:	viii)	5 minutos a uma temperatura de 72 °C (extensão final)
	(ix)	manter a uma temperatura de 4 °C.

Nota:

Este programa está optimizado para utilização com um termociclador MJ Research PTC 200. Para a utilização com outros modelos pode ser necessária a alteração da duração das fases dos ciclos ii), iii), iv), v), vi) e vii).

1.4. *Análise de restrição enzimática do fragmento amplificado*

Os produtos da PCR amplificados a partir de ADN de *C. m.* subsp. *sepedonicus* produzem um polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição característico com a enzima Bgl II após incubação a uma temperatura de 37 °C durante 30 minutos. Os fragmentos de restrição obtidos de um fragmento específico de *C. m.* subsp. *sepedonicus* possuem tamanhos de 282 bp e 220 bp.

2. **Preparação do tampão de carregamento**

2.1. *Azul de bromofenol (solução concentrada a 10 %)*

Azul de bromofenol	5 g
Água destilada (bidest)	50 ml

2.2. *Tampão de carregamento*

Glicerol (86 %)	3,5 ml
Azul de bromofenol (5.1)	300 µl
Água destilada (bidest)	6,2 ml

3. **Tampão de tris acetato EDTA (TAE) 10X, pH 8,0**

Tampão tris	48,4 g
Ácido acético glacial	11,42 ml
EDTA (sal dissódico)	3,72 g
Água destilada	1,00 L

Diluir até 1x antes de utilizar.

Também disponível comercialmente (por exemplo, Invitrogen ou equivalente).

▼M1

Apêndice 7

Reagentes validados para o teste FISH

1. **Sondas**

Sonda específica para *Cms* CMS--CY3-01	5'- ttg cgg ggc gca cat ctc tgc acg --3'
Sonda para eubactérias não específica EUB-338-FITC	5'- gct gcc tcc cgt agg agt -3'

2. **Solução fixadora**

[ATENÇÃO! O FIXADOR CONTÉM PARAFORMALDEÍDO, UM PRODUTO TÓXICO. UTILIZAR LUVAS E NÃO INALAR. É ACONSELHÁVEL TRABALHAR EM «HOTTE».]

i) Aquecer 9 ml de água de grau molecular (por exemplo, água ultra pura (UPW)) a cerca de 60 °C e adicionar 0,4 g de paraformaldeído. O paraformaldeído dissolve-se após a adição de 5 gotas de NaOH 1N e a agitação num agitador magnético.

ii) Ajustar o pH a 7,0 mediante adição de 1 ml de tampão fosfato 0,1 M (PB; pH 7,0) e 5 gotas de HCl 1N. Verificar o pH com papel indicador e ajustar, se necessário, com HCl ou NaOH.

[ATENÇÃO! NÃO UTILIZAR UM MEDIDOR DE PH EM SOLUÇÕES CONTENDO PARAFORMALDEÍDO.]

iii) Filtrar a solução através de um filtro de membrana de 0,22 µm e manter ao abrigo da poeira a 4 °C até à sua utilização.

iv) *Nota:*

Solução fixadora alternativa: etanol a 96 %.

3. **«Hybmix» 3X**

NaCl	2,7 M
Tris-HCl	60 mM (pH 7,4)
EDTA esterilizado por filtração e autoclavado)	15 mM

Diluir até 1x, conforme necessário.

4. **Solução de hibridação**

Hybmix 1X

Dodecilsulfato de sódio (SDS)	0,01 %
Sonda EUB 338	5 ng/µl
Sonda CMSCY301	5 ng/µl

Preparar quantidades de solução de hibridação de acordo com os cálculos do quadro 1. Para cada lâmina (contendo 2 amostras diferentes em duplicado) são necessários 90 µl de solução de hibridação.

Quadro: Quantidades sugeridas para a preparação da solução de hibridação.

	2 lâminas	8 lâminas
UPW esterilizada	50,1	200,4
Hybmix 3X	30,0	120,0
SDS 1 %	0,9	3,6
Sonda EUB 338 (100 ng/µl)	4,5	18,0
Sonda CMSCY301 (100 ng/µl)	4,5	18,0
Volume total (µl)	90,0	360,0

NB: Armazenar todas as soluções contendo sondas fotossensíveis na obscuridade a uma temperatura de –20 °C. Proteger da exposição directa à luz solar ou eléctrica durante a utilização.

5. **Tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0**

Na_2HPO_4	8,52 g

▼**M1**

KH_2PO_4	5,44 g
Água destilada	1,00 L

Dissolver os ingredientes, verificar o pH e esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

▼M1

Apêndice 8

Condições de cultivo de beringela

Semear beringelas (*Solanum melongena*) em tabuleiros com substrato pasteurizado apropriado. O transplante das plântulas faz-se quando os cotilédones estão completamente expandidos (10 a 14 dias) para vasos com substrato para cultura igualmente pasteurizado.

As beringelas devem ser cultivadas em estufa, nas seguintes condições ambientais:

Fotoperíodo		14 horas ou duração do dia natural se esta for superior;
Temperatura	diurna	21 a 24 °C,
	nocturna	15 °C.

Variedades de beringela susceptíveis: «Black Beauty»,
«Long Tom»,
«Rima»,
«Balsas»

Fornecedor: ver sítio *web* http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

▼M1

Apêndice 9

Coloração de Gram (modificação de Hucker) (Doetsch, 1981) ([1])

Solução de violeta de cristal

Dissolver 2 g de violeta de cristal em 20 ml de etanol a 95 %.

Dissolver 0,8 g de oxalato de amónio em 80 ml de água destilada.

Misturar as duas soluções.

Solução de Lugol

Iodo	1 g
Iodeto de potássio	2 g
Água destilada	300 ml

Triturar num almofariz o iodo e o iodeto de potássio. Adicionar à água e agitar num recipiente fechado até dissolução.

Solução de safranina para contraste

Solução concentrada:

Safranina O	2,5 g
Etanol a 95 %	100 ml

Misturar e guardar.

Diluir 1:10 para obter uma solução de trabalho.

Procedimento de coloração

1. Preparar esfregaços em lâminas de vidro, secá-los ao ar e fixá-los pelo calor.
2. Cobrir a lâmina com solução de violeta de cristal durante um minuto.
3. Lavar rapidamente com água corrente.
4. Cobrir com solução de Lugol durante um minuto.
5. Lavar com água corrente e secar com papel absorvente.
6. Descorar com etanol a 95 % em gotas até que este saia incolor, ou mergulhar em etanol com agitação suave durante 30 segundos.
7. Lavar em água corrente e secar com papel absorvente.
8. Cobrir com solução de safranina durante 10 segundos.
9. Lavar com água corrente e secar com papel absorvente.

As bactérias Gram-positivas coram de azul-violeta e as Gram-negativas de vermelho-rosado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anónimo, 1987. Scheme of the detection and diagnosis of the ring rot bacterium *Corynebacterium sepedonicum* in batches of potato tubers. Comissão das Comunidades Europeias, Luxemburgo. Publ EUR 11 288 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 Bol. 14 (2), 147-152.
4. Doetsch, R. N., 1981. Determinative methods of light microscopy. Em: Manual of methods for general bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, 21-23.
5. Hugh, R. e 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 fatty-acid analysis. Systematic and Applied Microbiology 14; 335-345.

([1]) Podem também ser utilizados soluções e *kits* de coloração disponíveis no mercado.

▼**M1**

7. Janse, J. D. e J. Van Vaerenbergh. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (*Corynebacterium sepedonicum*) in potato. EPPO Bol., N.º 17, 1987, pp. 1-10.

8. Jansing, H. e 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 e D. C. Sands, 1990. Methods in Phytobacteriology. Akadémiai Kiadó, 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 e A. C. Hayward, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads J. appl. Bact., 29, 470--489.

13. Lelliott, R. A. e P. W., Sellar, 1976. The detection of latent ring rot (*Corynebacterium sepedonicum* (Spiek. et Kotth.) Skapt. et Burkh.) in potato stocks. EPPO Bol. 6 (2), 101-106.

14. Li, X. e 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. e 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. Pastrik, K. -H. e R.A. Rainey. 1999. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. J. Phytopathology 147; 687-693.

17. Pastrik, 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. e 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.; Hennesy, J; Stead, D.E., 2001. Repetetive 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. e 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. e 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.

▼**M1**

ANEXO II

1. Para cada ocorrência suspeita relativamente à qual tenha sido identificado um resultado positivo no(s) teste(s) de rastreio, de acordo com os métodos estabelecidos no anexo I, e na pendência da confirmação ou refutação através do método referido, deve-se proceder à retenção e conservação adequada de:

   — todos os tubérculos e, sempre que possível, todas as plantas sujeitos a amostragem

   — qualquer extracto restante e outro material preparado para o(s) teste(s) de rastreio, por exemplo, lâminas de imunofluorescência,

   e

   — toda a documentação relevante,

   até à conclusão das análises dos métodos referidos.

   A retenção dos tubérculos permitirá a realização, sempre que necessária, do teste da variedade.

2. Em caso de confirmação da presença do organismo, deve-se proceder à retenção e à conservação adequada:

   — do material referido no n.º 1,

   — de uma amostra conservada de material de beringela infectado, inoculado com o extracto do tubérculo ou da planta,

   e

   — de uma cultura isolada do referido organismo,

   durante pelo menos um mês após a notificação nos termos do n.º 2 do artigo 5.º

▼**M1**

ANEXO III

1. Os elementos a considerar na determinação da extensão da contaminação provável nos termos da alínea b) do n.º 1 do artigo 5.º incluirão:

   — tubérculos ou plantas cultivadas no local de produção declarado contaminado nos termos da alínea a) do n.º 1 do artigo 5.º,

   — local ou locais de produção com alguma relação de produção com os tubérculos ou plantas declarados contaminados nos termos da alínea a) do n.º 1 do artigo 5.º, incluindo aqueles que partilham equipamento e instalações de produção directamente ou através de um contratante comum,

   — tubérculos ou plantas produzidos no local ou locais de produção referido (s) no travessão anterior ou presentes nesse local de produção durante o período em que os tubérculos ou plantas declarados contaminados nos termos da alínea a) do n.º 1 do artigo 5.º se encontravam no local de produção referido no primeiro travessão,

   — instalações que manuseiem batatas provenientes dos locais de produção referidos nos travessões anteriores,

   — quaisquer máquinas, veículos, recipientes, armazéns ou respectivas partes e quaisquer outros objectos, incluindo material de embalagem, que possam ter estado em contacto com os tubérculos ou com as batateiras declarados contaminados ao abrigo da alínea a) do n.º 1do artigo 5.º,

   — todos os tubérculos ou plantas armazenados em, ou em contacto com, quaisquer estruturas ou objectos constantes do travessão anterior, antes da limpeza e desinfecção dessas estruturas ou objectos,

   — na sequência dos testes realizados nos termos do artigo 6.º, os tubérculos ou as batateiras com uma relação clonal colateral ou ascendente com os tubérculos ou as plantas declarados contaminados nos termos da alínea a) do n.º 1 do artigo 5.º e para os quais, embora tenham apresentado resultados negativos quanto à presença do organismo, pareça existir a probabilidade de contaminação por via clonal. O teste de variedade pode ser efectuado no sentido de verificar a identidade dos tubérculos ou das batateiras contaminados e com uma relação clonal,

   — local(is) de produção de tubérculos e batateiras referidos no travessão anterior.

2. Os elementos a considerar na determinação da possível dispersão nos termos da alínea c) do n.º 1 do artigo 5.º incluirão:

   — a proximidade de outros locais de produção de batatas ou de outras plantas hospedeiras;

   — produção e utilização comuns de lotes de batata de semente.

3. A notificação a que se refere o primeiro parágrafo do n.º 2 do artigo 5.º conterá os seguintes dados:

   — imediatamente após a presença do organismo ter sido confirmada por testes laboratoriais, com recurso aos métodos estabelecidos no anexo I, pelo menos:

      — o nome da variedade do lote de batatas,

      — o tipo (de consumo, de semente, etc.) e, sempre que aplicável, a categoria da semente,

   — sempre que se verificar um risco de contaminação de batatas provenientes ou com destino a outro(s) Estado(s)-Membro(s), o Estado-Membro onde se tenha confirmado a ocorrência, deverá notificar imediatamente o(s) Estado(s)-Membro(s) em questão com a informação necessária em cumprimento do n.º 3 do artigo 5.º, tal como:

      — o nome da variedade do lote de batatas,

      — o nome e o endereço do expedidor e do destinatário,

      — a data da entrega do lote de batatas,

      — a dimensão do lote de batatas entregue,

      — uma cópia do passaporte fitossanitário ou, pelo menos, o número do passaporte fitossanitário, quando apropriado, ou sempre que adequado, o número de registo do produtor ou comerciante e uma cópia da nota de entrega.

   A Comissão deve ser notificada imediatamente sempre que tal informação seja fornecida.

   — Para cada caso e após a conclusão de todas as investigações:

      — a data de confirmação da contaminação,

▼M1

— uma descrição sucinta da investigação efectuada para identificar a fonte e a possível dispersão da contaminação, incluindo o nível de amostragem efectuado,

— informação sobre as fontes de contaminação identificadas ou presumidas,

— pormenores sobre a dimensão da contaminação declarada, incluindo o número de locais de produção e de lotes com uma indicação da variedade e, caso se trate de batatas para semente, da categoria,

— pormenores relativos à demarcação da zona, incluindo o número de locais de produção, não declarados como contaminados mas incluídos na zona,

— quaisquer outras informações relacionadas com o(s) surto(s) confirmado(s) que a Comissão venha a solicitar.

▼**M1**

ANEXO IV

1. As medidas sob controlo oficial a que se refere o n.º 1 do artigo 7.º consistirão:

— na utilização para a alimentação animal após tratamento térmico que garanta a impossibilidade de sobrevivência do organismo,

ou

— na eliminação num local adequado e oficialmente aprovado em que não existam riscos identificáveis de fuga do patogéneo para o ambiente, por exemplo, através de escorrência para terras agrícolas,

ou

— na incineração,

ou

— na transformação industrial através de entrega directa e imediata a uma unidade de transformação com instalações de eliminação de resíduos oficialmente aprovadas, relativamente aos quais se tenha concluído pela não existência de qualquer risco identificável de propagação do organismo, e com um sistema de limpeza e desinfecção, pelo menos, dos veículos de transporte que saem da referida unidade,

ou

— noutras medidas, desde que se tenha concluído que não existe qualquer risco identificável de propagação do organismo; essas medidas, bem como a respectiva justificação, devem ser notificadas à Comissão e aos restantes Estados-Membros.

Qualquer resíduo restante associado e com origem nos procedimentos mencionados *supra* serão eliminados através de métodos aprovados oficialmente, em conformidade com o anexo V da presente directiva.

2. A utilização ou eliminação adequada dos tubérculos ou das batateiras considerados como provavelmente contaminados ao abrigo da alínea b) do n.º 1 do artigo 5.º e a que se refere o n.º 2 do artigo 7.º, sob controlo dos organismos oficiais responsáveis dos Estados-Membros em causa, com a devida comunicação entre organismos oficiais responsáveis para garantir esse controlo a todo o momento e a aprovação pelo organismo oficial responsável do Estado-Membro em que a batata irá ser embalada ou transformada, no que diz respeito às instalações de eliminação de resíduos a que se referem os primeiro e segundo travessões, será:

— na utilização como batata de consumo, embalada para entrega e utilização directa, sem mudança de embalagem num local com instalações de eliminação de resíduos adequadas. As batatas destinadas à plantação apenas podem ser manuseadas no mesmo local, se tal for feito separadamente ou após limpeza e desinfecção,

ou

— na utilização como batata de consumo para transformação industrial e destinada a entrega directa e imediata a uma unidade de transformação com instalações adequadas de eliminação de resíduos e um sistema de limpeza e desinfecção, pelo menos, dos veículos de transporte,

ou

— qualquer outra utilização ou forma de eliminação, desde que seja comprovado que não existe qualquer risco reconhecido de dispersão do organismo e sob reserva de aprovação pelos referidos organismos oficiais responsáveis.

3. Os métodos adequados de limpeza e desinfecção dos objectos referidos no n.º 3 do artigo 7.º devem ser aqueles relativamente aos quais se concluiu que não existe qualquer risco identificável de dispersão do organismo, devendo ser utilizados sob controlo dos organismos oficiais responsáveis dos Estados-Membros.

4. A série de medidas a aplicar pelos Estados-Membros na zona demarcada estabelecida nos termos da alínea c) do n.º 1 do artigo 5.º e a que se refere o n.º 4 do artigo 7.º incluirá as seguintes acções:

4.1. Nos locais de produção declarados contaminados nos termos da alínea a) do n.º 1 do artigo 5.º:

(a) Num campo declarado contaminado nos termos da alínea a) do n.º 1 do artigo 5.º, quer:

i) — durante, pelo menos, os três anos de cultura seguintes ao da declaração de contaminação:

▼M1

— a adopção de medidas destinadas a eliminar as batateiras espontâneas e outras plantas hospedeiras naturais do organismo,

e

— a proibição de plantar tubérculos, plantas ou sementes verdadeiras de batateira, ou outras plantas que possam ser um hospedeiro natural do organismo, ou culturas relativamente às quais exista um risco identificado de dispersão do organismo,

— na primeira época de colheita de batata subsequente ao período especificado no travessão anterior, e sob condição de o campo ter sido considerado livre de batateiras espontâneas e de outras plantas hospedeiras naturais do organismo durante inspecções oficiais, pelo menos, nos dois anos de cultura consecutivos antes da plantação, apenas será permitida a produção de batata de consumo e os tubérculos colhidos deverão ser testados em conformidade com o procedimento referido no anexo I;

— no período de colheita de batata seguinte ao referido no travessão anterior e após um ciclo de rotação adequado, que será de no mínimo dois anos caso se cultivem batatas, poderão ser plantadas batatas, tanto para a produção de batata de semente como de batata de consumo, e será efectuada uma prospecção oficial nos termos do n.º 1 do artigo 2.º; quer

ii) — durante os quatro anos de cultura seguintes ao da declaração de contaminação:

— a adopção de medidas destinadas a eliminar as batateiras espontâneas e outras plantas hospedeiras naturais do organismo,

e

— a colocação e manutenção do campo em pousio ou em pastagem permanente com pastoreio intensivo ou com cortes curtos frequentes,

— na primeira época de colheita de batata subsequente ao período especificado no travessão anterior, e sob condição de o campo ter sido considerado livre de batateiras espontâneas e de outras plantas hospedeiras naturais do organismo durante inspecções oficiais, pelo menos, nos dois anos de cultura consecutivos antes da plantação, será permitida a produção de batata de consumo ou de semente e os tubérculos colhidos deverão ser testados em conformidade com o procedimento referido no anexo I;

(b) em todos os restantes campos do local de produção contaminado e sob condição que os organismos oficiais responsáveis obtenham a garantia de que foi eliminado o risco de aparecimento de batateiras espontâneas e de outras plantas hospedeiras naturais do organismo:

— no ano de cultura seguinte ao da declaração de contaminação não serão plantados tubérculos, plantas ou sementes verdadeiras de batateira nem qualquer outra planta que possa constituir um hospedeiro natural do organismo, ou

— podem ser plantadas batatas de semente certificadas, apenas para a produção de batata de consumo,

— no segundo ano de cultura seguinte ao da declaração de contaminação só serão plantadas, para obtenção de semente ou de batata para consumo, batatas de semente certificadas ou oficialmente testadas para determinar a ausência da podridão anelar e cultivadas sob controlo oficial em locais de produção à excepção dos enumerados em 4.1,

— pelo menos durante o terceiro ano de cultivo após a declaração de contaminação, só serão plantadas, para obtenção de semente ou de batata para consumo, batatas de semente certificadas ou cultivadas sob controlo oficial, a partir de batatas de semente certificadas,

— em cada um dos anos de cultivo referidos nos travessões anteriores, serão tomadas medidas para eliminar batateiras espontâneas e outras plantas hospedeiras naturais do organismo, caso surjam, e serão efectuados testes oficiais às batatas colhidas em cada campo, em conformidade com o procedimento constante do anexo I;

▼M1

(c) Imediatamente após a declaração de contaminação nos termos da alínea a) do n.º 1 do artigo 5.º e após o primeiro ano de cultura seguinte, toda a maquinaria e instalações de armazenamento existentes no local de produção e ligadas à produção de batata serão limpas e desinfectadas, de modo adequado utilizando métodos apropriados, nos termos do ponto 3;

(d) numa unidade de produção de culturas protegidas em que seja possível a substituição completa do meio de cultura:

— não serão plantados tubérculos, plantas ou sementes verdadeiras de batateira, a não ser que a unidade de produção tenha sido sujeita a medidas oficialmente controladas destinadas a eliminar o organismo e a retirar qualquer material de plantas hospedeiras, incluindo, pelo menos, uma mudança completa do meio de cultura e a limpeza e desinfecção da unidade de produção e de todo o equipamento e, em seguida, que os organismos oficiais responsáveis tenham concedido a aprovação para a produção de batata,

e

— a produção de batata será realizada a partir de batata de semente certificada ou de minitubérculos ou de microplântulas provenientes de fontes testadas.

4.2. Na zona demarcada, sem prejuízo das medidas a que se refere o ponto 4.1, os Estados-Membros:

a) exigirão, imediatamente após a declaração de contaminação, a limpeza e desinfecção de toda a maquinaria e dos armazéns das referidas instalações envolvidas na produção da batata, consoante for apropriado, utilizando métodos adequados, tal como disposto no ponto 3,

b) Imediatamente após a declaração de contaminação e durante, pelo menos, três anos de cultura:

— controlarão, através dos organismos oficiais responsáveis, as explorações que cultivem, armazenem ou manuseiem tubérculos de batata, assim como as explorações que utilizem para o efeito maquinaria em regime de contratação,

— exigirão, para todas as culturas de batata da zona, que só sejam plantadas batatas de semente certificadas ou sementes cultivadas sob controlo oficial e que sejam analisadas após colheita as culturas de batata de semente efectuadas em locais de produção declarados como provavelmente contaminados nos termos da alínea b) do n.º 1 do artigo 5.º,

— exigirão que os lotes de batata de semente e de batata de consumo colhidos na zona sejam manuseadas separadamente ou um sistema de limpeza e desinfecção entre o manuseamento de lotes para semente e para consumo,

— realizarão uma prospecção oficial nos termos do n.º 1 do artigo 2.º;

c) Estabelecerão, quando adequado, um programa de substituição de todos os lotes de batata semente ao longo de um período adequado.

▼**M1**

ANEXO V

Os métodos de eliminação de resíduos oficialmente aprovados referidos no ponto 1 do anexo IV cumprirão as seguintes disposições de forma a prevenir qualquer risco identificável de dispersão do organismo:

i) Os resíduos de batata (incluindo batatas rejeitadas e cascas de batata) e quaisquer outros resíduos sólidos associados às batatas (incluindo terra, pedras e outro detritos) serão eliminados,

— num local de eliminação adequado e oficialmente aprovado em que não existam riscos identificáveis de fuga do organismo para o ambiente, por exemplo, através de escorrência para terras agrícolas. Os resíduos serão enviados directamente para o local em condições de confinamento de forma a que não exista risco de perda de resíduos,

ou

— por incineração,

ou

— por outras medidas, desde que se tenha concluído que não existe qualquer risco identificável de propagação do organismo; essas medidas devem ser notificadas à Comissão e aos restantes Estados-Membros.

ii) Os resíduos líquidos: antes da eliminação, os resíduos líquidos contendo sólidos em suspensão serão sujeitos a filtração ou processos de decantação para remover tais sólidos. Estes sólidos serão eliminados em conformidade com o referido na alínea i).

Os resíduos líquidos serão, então:

— aquecidos a uma temperatura mínima de 60 °C atingida em todo o volume durante, pelo menos, 30 minutos antes da eliminação,

ou

— eliminados através de outro método sujeito a aprovação e controlo oficial, por forma a que não exista nenhum risco identificável de que os resíduos possam entrar em contacto com as terras agrícolas. Os respectivos pormenores devem ser notificados aos restantes Estados-Membros e à Comissão.

As opções descritas no presente anexo também se aplicam aos resíduos associados ao manuseamento, à eliminação e à transformação de lotes contaminados.