32006L0063

DIRECTIVA 2006/63/CE A COMISIEI
din 14 iulie 2006
de modificare a anexelor II-VII la Directiva 98/57/CE a Consiliului privind combaterea *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*

COMISIA COMUNITĂȚILOR EUROPENE,

având în vedere Tratatul de instituire a Comunității Europene,

având în vedere Directiva 98/57/CE a Consiliului din 20 iulie 1998 privind combaterea *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* [1], în special articolul 11,

întrucât:

(1) Unul dintre principalele organisme dăunătoare care se găsesc la cartof și tomată este *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, agentul patogen responsabil pentru ofilirea bacteriană a cartofului și a tomatei (denumit în continuare „organism").

(2) Organismul este încă prezent în anumite părți ale Comunității.

(3) Directiva 98/57/CE a definit măsurile detaliate pe care statele membre trebuie să le adopte împotriva organismului respectiv pentru a localiza și a determina răspândirea acestuia, pentru a preveni apariția și răspândirea acestuia și, în cazul în care este detectat, pentru a preveni răspândirea și a-l combate în vederea eradicării.

(4) Între timp, s-au înregistrat progrese importante în ceea ce privește înțelegerea biologiei și procedurile de detectare și de identificare a organismului. De asemenea, experiența practică acumulată în combaterea organismului necesită revizuirea mai multor dispoziții tehnice legate de măsurile de combatere.

(5) Ținând seama de aceste progrese, este necesar să se actualizeze măsurile prevăzute în anumite anexe la Directiva 98/57/CE.

(6) În ceea ce privește procedurile de detectare și identificare, a fost introdusă hibridizarea fluorescentă *in situ* (FISH), o metodă modernă de detectare. De asemenea, au fost incluse îmbunătățirile aduse metodei PCR (reacție în lanț a polimerazei), diferitelor elemente tehnice ale procedurii actuale de detectare și identificare, precum și metodelor de detectare și identificare a organismului în alte plante gazdă decât cartoful, în apă și în sol.

(7) În ceea ce privește elementele tehnice ale măsurilor de combatere, au fost prevăzute dispoziții îmbunătățite pentru modul de păstrare a eșantioanelor testate pentru a garanta trasabilitatea organismului, elementele necesare pentru a stabili scara contaminării probabile, detaliile privind notificarea unei prezențe confirmate a organismului și zona contaminată în cauză și măsurile care trebuie luate în locurile de producție desemnate ca fiind contaminate și în zonele delimitate. De asemenea, au fost incluse câteva dispoziții privind tomatele, cu scopul de a acorda mai multă atenție relevanței acestei plante ca gazdă pentru organism.

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

ADOPTĂ PREZENTA DIRECTIVĂ:

Articolul 1

Anexele II-VII la Directiva 98/57/CE se înlocuiesc cu textele corespunzătoare ale anexei la prezenta directivă.

Articolul 2

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

Statele membre aplică aceste dispoziții de la 1 aprilie 2007.

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

[1] JO L 235, 21.8.1998, p. 1.

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

Articolul 3

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

Articolul 4

Prezenta directivă se adresează statelor membre.

Adoptată la Bruxelles, 14 iulie 2006.

Pentru Comisie

Markos KYPRIANOU

Membru al Comisiei

ANEXĂ

„ANEXA II

PROTOCOL DE TESTARE PENTRU DIAGNOSTICAREA, DETECTAREA ȘI IDENTIFICAREA *RALSTONIA SOLANACEARUM* (SMITH) YABUUCHI *ET AL.*

DOMENIUL DE APLICARE AL PROTOCOLULUI DE TESTARE

Protocolul prezentat în continuare descrie diversele etape care trebuie urmate pentru:

(i) diagnosticarea ofilirii bacteriene la tuberculii de cartof și la plantele gazdă de cartof și tomate, precum și la alte câteva plante gazdă;

(ii) detectarea *Ralstonia solanacearum* în eșantioanele de tuberculi de cartof, de cartof de sămânță, tomate și alte plante gazdă, în apă sau în sol;

(iii) identificarea *Ralstonia solanacearum (R. solanacearum).*

CUPRINS

		Pagină
	Principii generale	61
SECȚIUNEA I:	Aplicarea protocolului de testare	61
	1. Procedura de detectare pentru diagnosticarea ofilirii bacteriene (*R. solanacearum*) la tuberculii de cartof și la plantele de cartof și tomate sau la alte plante gazdă care prezintă simptome de ofilire bacteriană	61
	2. Procedura pentru detectarea și identificarea *R. solanacearum* în eșantioanele de tuberculi de cartof asimptomatici	64
	3. Procedura pentru detectarea și identificarea *R. solanacearum* în eșantioanele de cartof de sămânță și de tomată sau alte plante gazdă asimptomatice	67
SECȚIUNEA II:	Metode detaliate pentru detectarea *R. solanacearum* în tuberculii de cartof, plantele gazdă de cartof și de tomată sau alte plante gazdă care prezintă simptome de ofilire bacteriană	69
	1. Simptome	69
	2. Teste de selecție rapidă	69
	3. Procedură de izolare	70
	4. Teste de identificare a *R. solanacearum*	70
SECȚIUNEA III:	1. Metode detaliate pentru detectarea și identificarea *R. solanacearum* în eșantioanele de tuberculi de cartof asimptomatici	70
	1.1. Pregătirea eșantionului	70
	1.2. Teste	72
	2. Metode detaliate pentru detectarea și identificarea *R. solanacearum* în eșantioanele de plante gazdă de cartof și tomată sau alte plante asimptomatice	72
	2.1. Pregătirea eșantionului	72
	2.2. Teste	73
SECȚIUNEA IV:	1. Procedură pentru detectarea și identificarea *R. solanacearum* în apă	74
	2. Metode pentru detectarea și identificarea *R. solanacearum* în apă	76
	2.1. Pregătirea eșantionului	76
	2.2. Teste	76
SECȚIUNEA V:	1. Procedură pentru detectarea și identificarea *R. solanacearum* în sol	77
	2. Metode pentru detectarea și identificarea *R. solanacearum* în sol	79
	2.1. Pregătirea eșantioanelor	79
	2.2. Teste	79

Pagină

SECȚIUNEA VI: Protocoale optimizate pentru detectarea și identificarea *R. solanacearum* 79

A. Diagnostic și teste de detectare 79

1. Testul eliminării exsudatului bacterian din tulpină 79
2. Detectarea granulelor de poli-β-hidroxibutirat (PHB) 79
3. Testul de sero-aglutinare 80
4. Izolarea selectivă 81
   - 4.1. Testul de însămânțare pe medii selective 81
   - 4.2. Procedura de îmbogățire 81
5. Testul de imunofluorescență (testul IF) 82
6. Testul de reacție în lanț a polimerazei (testul PCR) 85
   - 6.1. Metode de purificare a ADN 86
     - (a) Metoda Pastrik (2000) 86
     - (b) Alte metode 86
   - 6.2. PCR 87
   - 6.3. Analiza produsului PCR 87
7. Testul FISH 88
8. Testele ELISA 90
   - (a) ELISA indirect 90
   - (b) DAS-ELISA 91
9. Testul biologic 92

B. Teste de identificare 93

1. Testele de identificare nutrițională și enzimatică 93
2. Testul IF 93
3. Testul ELISA 94
4. Testul PCR 94
5. Testul FISH 94
6. Testul de profil al acizilor grași (FAP) 94
7. Metodele de caracterizare a sușei 94
   - 7.1. Determinarea biovarului 94
   - 7.2. Amprenta genomică 95
   - 7.3. Metodele PCR 95

C. Test de confirmare 95

Apendicele 1 Laboratoarele care practică optimizarea și validarea protocoalelor 97

Apendicele 2 Mediile de izolare și de cultură a *R. solanacearum* 98

Apendicele 3 (A) Materialul de control standardizat disponibil în comerț 100

(B) Pregătirea controalelor 101

Apendicele 4 Tampoanele pentru procedurile de testare 103

Apendicele 5 Stabilirea gradului de contaminare la testele IF și FISH 106

Apendicele 6 Protocoalele PCR și reactivii validați 107

Apendicele 7 Reactivi validați pentru testul FISH 112

Apendicele 8 Condiții de cultură pentru tomate și vinete 114

Bibliografie 115

PRINCIPII GENERALE

Protocoalele optimizate pentru diversele metode, reactivii validați și detaliile pregătirii materialului necesar pentru teste și controale figurează în apendice. O listă a laboratoarelor reținute pentru optimizarea și validarea protocoalelor este prevăzută în apendicele 1.

Dat fiind faptul că protocoalele implică detectarea unui organism dăunător care trebuie pus sub carantină și includ utilizarea culturilor viabile de *R. solanacearum*, în calitate de material de control, este necesară aplicarea procedurilor în condiții de carantină corespunzătoare care prevăd instalații adecvate de eliminare a deșeurilor și în condiții de existență a unor licențe corespunzătoare eliberate de către autoritățile oficiale de carantină.

Parametrii testelor trebuie să garanteze o detectare coerentă și reproductibilă a nivelurilor de *R. solanacearum* la pragurile stabilite prin metodele selecționate.

Pregătirea exactă a controalelor pozitive este imperativă.

Efectuarea testelor în conformitate cu pragurile impuse implică, de asemenea, stabilirea parametrilor corecți, întreținerea și calibrarea echipamentelor, manipularea și păstrarea corectă a reactivilor și toate măsurile menite să împiedice contaminarea între eșantioane, de exemplu, separarea controalelor pozitive și a eșantioanelor testelor. Trebuie aplicate standarde de control de calitate pentru a evita erori administrative și de alt gen, în special în ceea ce privește etichetarea și documentarea.

O apariție suspectă, în sensul articolului 4 alineatul (2) din Directiva 98/57/CE, implică un rezultat pozitiv al testelor de diagnostic sau de selecție realizate asupra unui eșantion în conformitate cu diagramele funcționale prezentate în continuare. Un prim test de selecție pozitiv (test IF, PCR/FISH, izolare selectivă) trebuie confirmat de un al doilea test de selecție bazat pe un alt principiu biologic.

În cazul în care primul test de selecție este pozitiv, se suspectează o contaminare cu *R. solanacearum* și trebuie efectuat al doilea test de selecție. În cazul în care al doilea test de selecție este pozitiv, presupunerea se confirmă (apariție suspectată) și trebuie continuate testele în conformitate cu procedura. În cazul în care al doilea test de selecție este negativ, eșantionul este considerat necontaminat cu *R. solanacearum*.

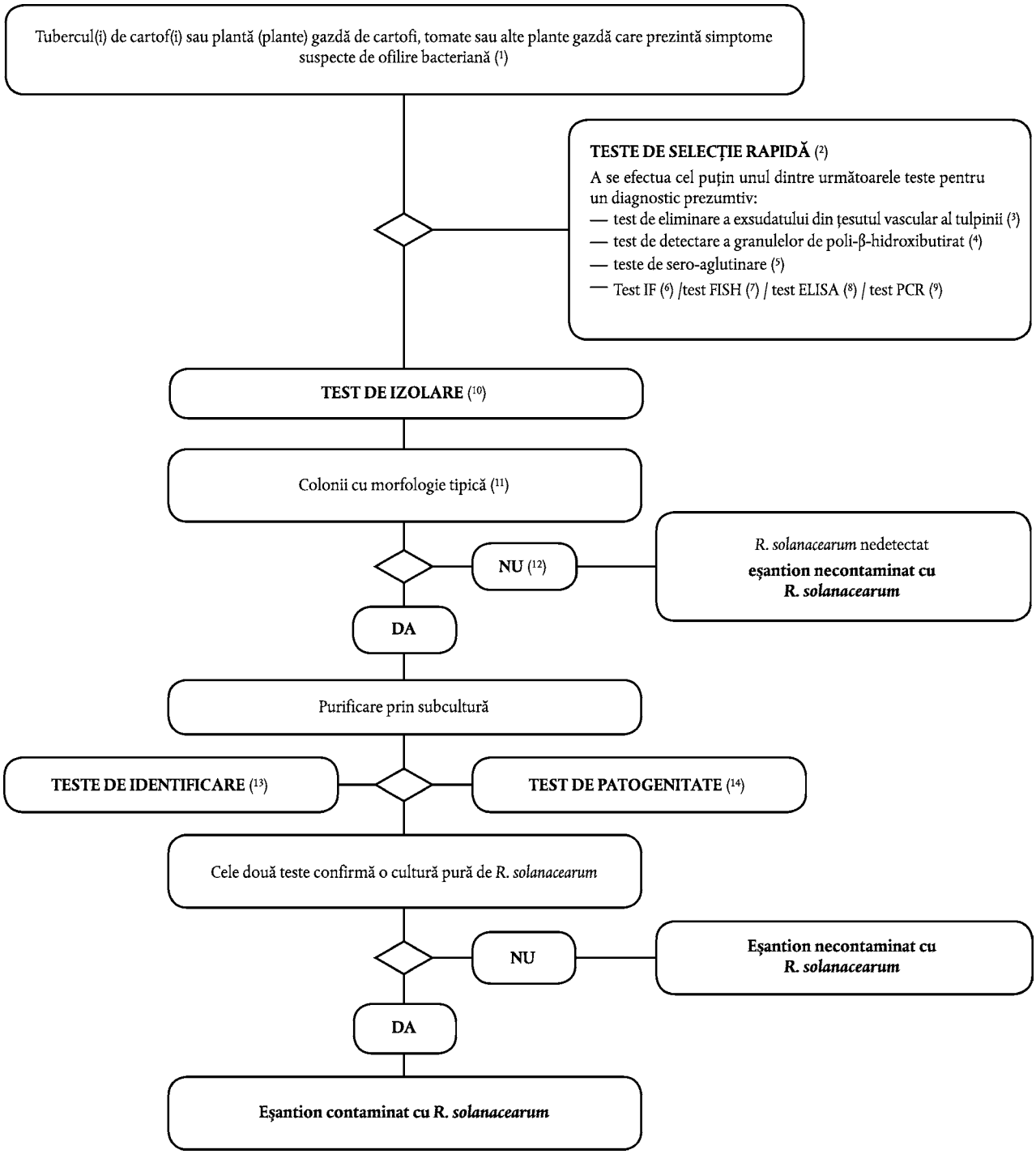
Prezența confirmată menționată la articolul 5 alineatul (1) din Directiva 98/57/CE implică izolarea și identificarea unei culturi pure de *R. solanacearum* cu confirmarea patogenității.

SECȚIUNEA I

APLICAREA PROTOCOLULUI DE TESTARE

(1) **Procedura de detectare pentru diagnosticarea ofilirii bacteriene (*Ralstonia solanacearum*) la tuberculii de cartof și la plantele gazdă de cartof și tomată sau la alte plante gazdă care prezintă simptome de ofilire bacteriană**

Protocolul de testare este destinat tuberculilor de cartof și plantelor cu simptome tipice sau suspecte de ofilire bacteriană. Presupune un test de selecție rapidă, izolarea agentului patogen din țesutul vascular infectat pe un mediu (selectiv) și, în cazul unui rezultat pozitiv, identificarea culturii ca fiind *Ralstonia solanacearum*.


Tubercul(i) de cartof(i) sau plantă (plante) gazdă de cartofi, tomate sau alte plante gazdă care prezintă simptome suspecte de ofilire bacteriană (1)
TESTE DE SELECȚIE RAPIDĂ (2)
A se efectua cel puțin unul dintre următoarele teste pentru un diagnostic prezumtiv:
— test de eliminare a exsudatului din țesutul vascular al tulpinii (3)
— test de detectare a granulelor de poli-β-hidroxibutirat (4)
— teste de sero-aglutinare (5)
— Test IF (6) /test FISH (7) / test ELISA (8) / test PCR (9)
TEST DE IZOLARE (10)
Colonii cu morfologie tipică (11)
NU (12)
R. solanacearum nedetectat
eșantion necontaminat cu R. solanacearum
DA
Purificare prin subcultură
TESTE DE IDENTIFICARE (13)
TEST DE PATOGENITATE (14)
Cele două teste confirmă o cultură pură de R. solanacearum
NU
Eșantion necontaminat cu R. solanacearum
DA
Eșantion contaminat cu R. solanacearum

(1) Descrierea simptomelor este prevăzută la secțiunea II.1.

(2) Testele de selecție rapidă ușurează diagnosticul prezumtiv, dar nu sunt esențiale. Un rezultat negativ nu garantează întotdeauna absența agentului patogen.

(3) Testul de eliminare a exsudatului din țesutul vascular al tulpinii este descris în secțiunea VI.A.1.

(4) Testul de detectare a granulelor de poli-β-hidroxibutirat în celulele bacteriene este descris în secțiunea VI.A.2.

(5) Testele de sero-aglutinare asupra exsudatului bacterian sau a extraselor din țesuturile simptomatice sunt descrise în secțiunea VI.A.3.

(6) Testul IF asupra exsudatului bacterian în suspensie în apă sau asupra extraselor din țesuturi simptomatice este descris în secțiunea VI.A.5.

(7) Testul FISH asupra exsudatului bacterian în suspensie în apă sau asupra extraselor din țesuturi simptomatice este descris în secțiunea VI.A.7.

(8) Testul ELISA asupra exsudatului bacterian în suspensie în apă sau asupra extraselor din țesuturi simptomatice este descris în secțiunea VI.A.8.

(9) Testul PCR asupra exsudatului bacterian în suspensie în apă sau asupra extraselor din țesuturi simptomatice este descris în secțiunea VI.A.6.

(10) În general, agentul patogen se izolează ușor din materialul vegetal simptomatic prin diluare sau însămânțare pe mediul nutritiv (secțiunea II.3).

(11) Morfologia coloniei tipice este descrisă în secțiunea II.3.d.

(12) Cultivarea riscă să eșueze în stadiile avansate de infectare din cauza concurenței sau a înmulțirii bacteriilor saprofite. În cazul în care simptomele bolii sunt caracteristice, dar testul de izolare este negativ, izolarea trebuie repetată, de preferință printr-un test de diluare și însămânțare pe medii selective.

(13) Identificarea fiabilă a culturilor pure de izolări prezumtive de R. solanacearum necesită efectuarea testelor descrise în secțiunea VI.B. O caracterizare subspecifică este facultativă, dar recomandată pentru fiecare caz nou.

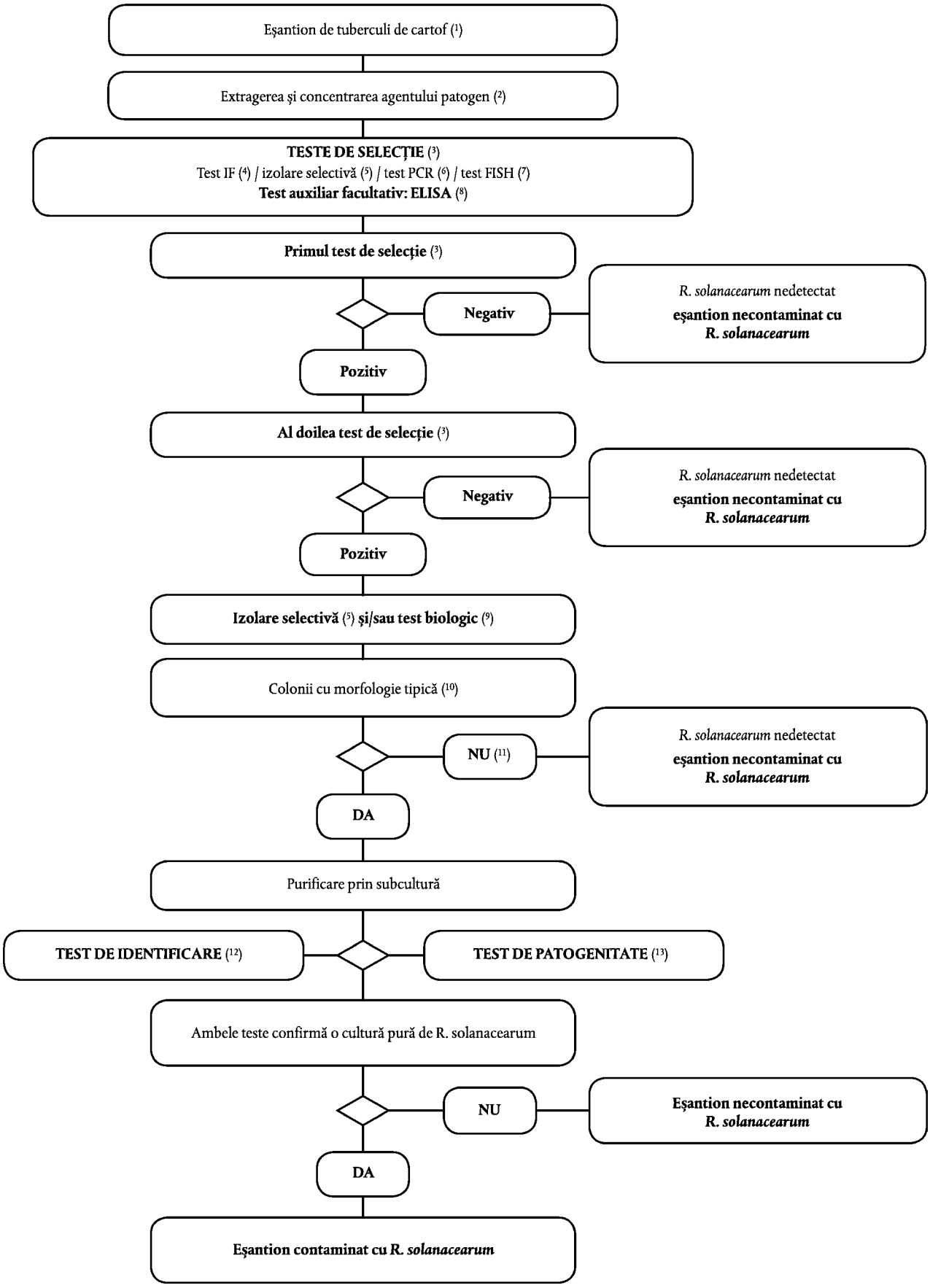
(14) Testul de patogenitate este descris în secțiunea VI.C.

(2) **Procedura pentru detectarea și identificarea *Ralstonia solanacearum* în eșantioanele de tuberculi de cartof asimptomatici**

Principiu

Protocolul de testare este destinat detectării infecțiilor latente în tuberculii de cartof. Un rezultat pozitiv a cel puțin două teste de selecție bazate pe principii biologice diferite trebuie completat prin izolarea agentului patogen, urmată, în cazul izolării coloniilor caracteristice, de confirmarea unei culturi pure ca fiind *R. solanacearum*. Un rezultat pozitiv la un singur test de selecție nu este suficient pentru a considera eșantionul ca fiind suspect.

Testele de selecție și testele de izolare trebuie să permită detectarea a 10^3-10^4 celule pe ml de extract concentrat în suspensie, incluse în fiecare serie de teste în calitate de controale pozitive.


Eșantion de tuberculi de cartof (1)
Extragerea și concentrarea agentului patogen (2)
TESTE DE SELECȚIE (3)
Test IF (4) / izolare selectivă (5) / test PCR (6) / test FISH (7)
Test auxiliar facultativ: ELISA (8)
Primul test de selecție (3)
Negativ
R. solanacearum nedetectat
eșantion necontaminat cu R. solanacearum
Pozitiv
Al doilea test de selecție (3)
Negativ
R. solanacearum nedetectat
eșantion necontaminat cu R. solanacearum
Pozitiv
Izolare selectivă (5) și/sau test biologic (9)
Colonii cu morfologie tipică (10)
NU (11)
R. solanacearum nedetectat
eșantion necontaminat cu R. solanacearum
DA
Purificare prin subcultură
TEST DE IDENTIFICARE (12)
TEST DE PATOGENITATE (13)
Ambele teste confirmă o cultură pură de R. solanacearum
NU
Eșantion necontaminat cu R. solanacearum
DA
Eșantion contaminat cu R. solanacearum

(1) Mărimea standard a eșantionului este de două sute de tuberculi. Cu toate acestea, protocolul poate fi aplicat eșantioanelor mai mici în cazul în care nu sunt disponibili două sute de tuberculi.

(2) Extragerea agentului patogen și metodele de concentrare sunt descrise în secțiunea III.1.1.

(3) În cazul în care cel puțin două teste bazate pe principii biologice diferite sunt pozitive, trebuie efectuate izolarea și confirmarea. A se efectua cel puțin un test de selecție. În cazul în care acest test este negativ, eșantionul este considerat ca fiind negativ. În cazul în care acest test este pozitiv, este nevoie de al doilea sau mai multe teste de selecție bazate pe principii biologice diferite pentru a verifica primul rezultat pozitiv. În cazul în care al doilea test sau celelalte teste sunt negative, eșantionul este considerat ca fiind negativ. Nu sunt necesare alte teste.

(4) Testul IF este descris în secțiunea VI.A.5.

(5) Testul de izolare selectivă este descris în secțiunea VI.A.4.

(6) Testele PCR sunt descrise în secțiunea VI.A.6.

(7) Testul FISH este descris în secțiunea VI.A.7.

(8) Testele ELISA sunt descrise în secțiunea VI.A.8.

(9) Testul biologic este descris în secțiunea VI.A.9.

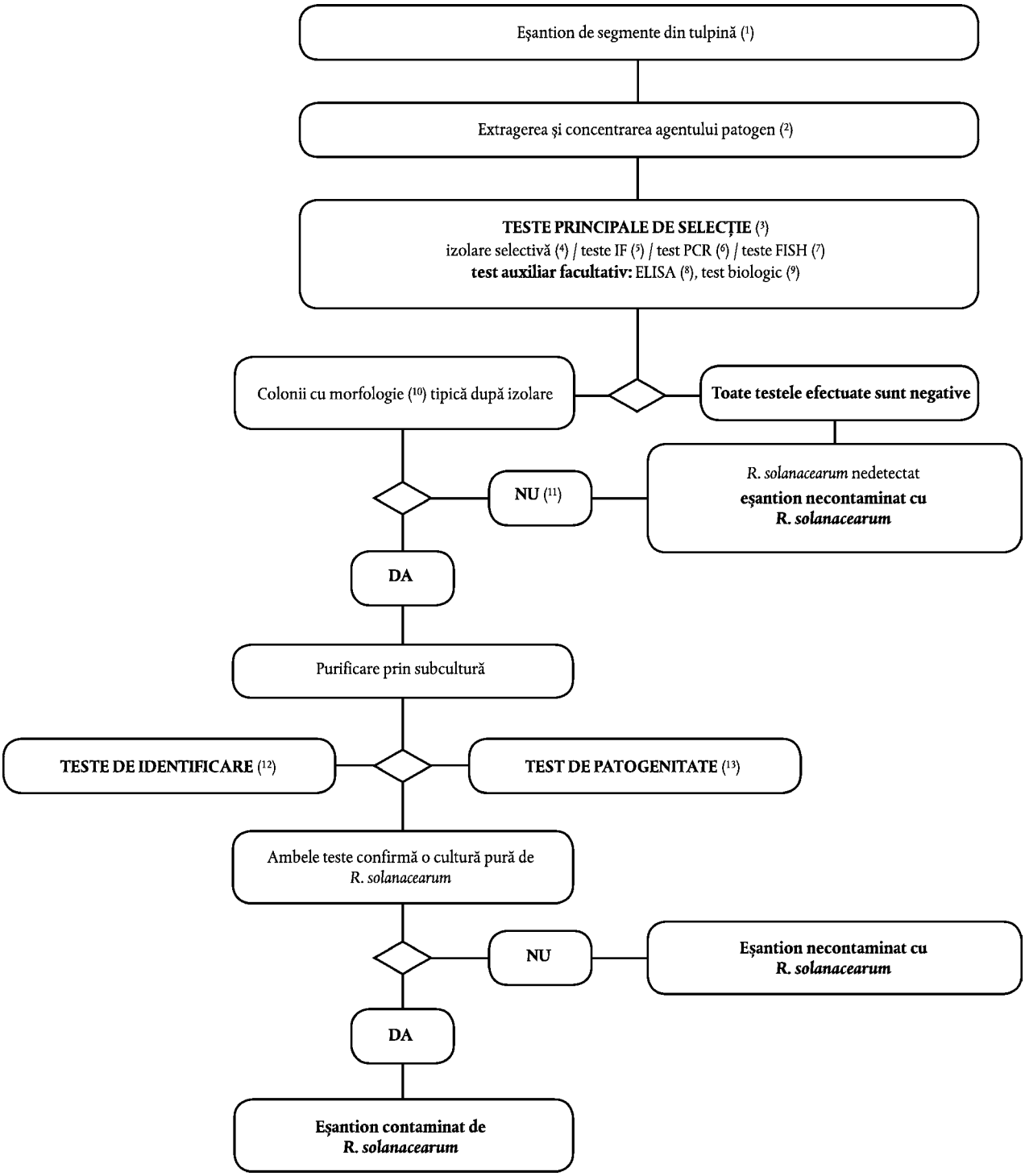
(10) Morfologia tipică a coloniei este descrisă în secțiunea II.3.d.

(11) Cultivarea sau testele biologice riscă să eșueze din cauza concurenței sau a inhibării bacteriilor saprofite. În cazul în care se obțin rezultate pozitive clare în urma testelor de selecție, însă testele de izolare sunt negative, trebuie repetate testele de izolare din același extract concentrat sau din țesut vascular suplimentar prelevat de la talonul tuberculilor tăiați din același eșantion și, după caz, trebuie testate eșantioane suplimentare.

(12) Identificarea fiabilă a culturilor pure de izolări prezumtive de R. solanacearum necesită efectuarea testelor descrise în secțiunea VI.B.

(13) Testul de patogenitate este descris în secțiunea VI.C.

(3) **Procedură pentru detectarea și identificarea *Ralstonia solanacearum* în eșantioanele de plante gazdă de cartofi și tomate sau alte plante gazdă asimptomatice**



(1) Pentru mărimea recomandată a eşantioanelor a se vedea secţiunea III.2.1.

(2) Extragerea agentului patogen şi metodele de concentrare sunt descrise în secţiunea III.2.1.

(3) În cazul în care cel puţin două teste bazate pe principii biologice diferite sunt pozitive, trebuie efectuate izolarea şi confirmarea. A se efectua cel puţin un test de selecţie. În cazul în care acest test este negativ, eşantionul este considerat ca fiind negativ. În cazul în care acest test este pozitiv, este nevoie de al doilea sau mai multe teste de selecţie bazate pe principii biologice diferite pentru a verifica primul rezultat pozitiv. În cazul în care al doilea test sau celelalte teste sunt negative, eşantionul este considerat ca fiind negativ. Nu sunt necesare alte teste.

(4) Testul de izolare selectivă este descris în secţiunea VI.A.4.

(5) Testul IF este descris în secţiunea VI.A.5.

(6) Testele PCR sunt descrise în secţiunea VI.A.6.

(7) Testul FISH este descris în secţiunea VI.A.7.

(8) Testele ELISA sunt descrise în secţiunea VI.A.8.

(9) Testul biologic este descris în secţiunea VI.A.9.

(10) Morfologia tipică a coloniei este descrisă în secţiunea II.3.d.

(11) Cultivarea sau testele biologice riscă să eşueze din cauza concurenţei sau a inhibării bacteriilor saprofite. În cazul în care se obţin rezultate pozitive clare în urma testelor de selecţie, însă testele de izolare sunt negative, trebuie repetate testele de izolare.

(12) Identificarea fiabilă a culturilor pure de izolări prezumtive de R. solanacearum se obţine prin efectuarea testelor descrise în secţiunea VI.B.

(13) Testul de patogenitate este descris în secţiunea VI.C.

SECȚIUNEA II

METODE DETALIATE PENTRU DETECTAREA *RALSTONIA SOLANACEARUM* LA TUBERCULII DE CARTOF ȘI LA PLANTELE GAZDĂ DE CARTOF ȘI DE TOMATĂ SAU LA ALTE PLANTE GAZDĂ CU SIMPTOME DE OFILIRE BACTERIANĂ

1. **Simptome** (a se vedea website-ul http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main)

1.1. Simptome la cartof

Planta de cartof. Stadiul incipient al infecției în câmp este reprezentat de ofilirea frunzelor înspre vârful plantei în timpul temperaturilor diurne ridicate și de revenirea la aspect normal în timpul nopții. În cursul primelor stadii de ofilire, frunzele rămân verzi, dar mai târziu apare o îngălbenire și o necroză brună. De asemenea, apare epinastia. Ofilirea unui lăstar sau a unor plante întregi devine repede ireversibilă și duce la moartea plantei. Țesutul vascular în secțiune transversală prin tulpina plantelor ofilite poate deveni brun și un exsudat lăptos iese de la suprafața tăieturii sau poate fi stors ușor prin presare. Atunci când se pune o tulpină tăiată în poziție verticală în apă, se preling fire vâscoase din canalele vasculare.

Tuberculul de cartof. Tuberculii de cartof trebuie tăiați transversal aproape de talon (stolon) sau longitudinal până la stolon. Stadiul incipient al infecției este o decolorare sticloasă galben spre brun deschis a inelului vascular din care iese o scurgere crem pal în mod spontan după câteva minute. Ulterior, decolorarea vasculară devine de un brun mai distinct, iar necroza se poate extinde la țesutul parenchimatos. În stadii avansate, infecția izbucnește în exterior de la talon și de la ochi și se poate observa un lichid bacterian care provoacă aderarea particulelor de sol. Coaja tuberculilor poate prezenta leziuni de culoare brun-roșcat ușor adâncite provocate de colapsul intern al țesutului vascular. În stadiile avansate ale bolii apar deseori evoluții secundare de putregaiuri fungice și bacteriene.

1.2. Simptome la tomate

Planta de tomată. Primul simptom vizibil este aspectul slăbit al frunzelor tinere. În condiții favorabile pentru agentul patogen (temperatura solului circa 25 °C, umiditate saturată), epinastia și ofilirea unei părți sau a întregii plante se produce în câteva zile și duce la colapsul total al plantei. În condiții mai puțin favorabile (temperatura solului sub 21 °C), ofilirea este mai puțin pronunțată, dar se poate dezvolta un număr mare de rădăcini adventive pe tulpină. Este posibilă observarea unui cordon gras de-a lungul tulpinii, plecând de la baza acesteia, care este dovada necrozei sistemului vascular. În cazul în care tulpina este tăiată transversal, țesuturile vasculare brune decolorate ale tulpinii elimină picături dintr-un exsudat bacterian alb sau gălbui.

1.3. Simptome la alte plante gazdă

Solanum dulcamara și *S. nigrum*. În condiții naturale se observă rareori simptome de ofilire la aceste buruieni gazdă, cu excepția cazurilor în care temperatura solului este mai mare de 25 °C sau nivelurile de *inoculum* sunt extrem de ridicate (de exemplu, pentru *S. nigrum* care se dezvoltă în vecinătatea plantelor de cartof sau de tomată bolnave). În cazul în care intervine ofilirea, simptomele sunt identice cu cele descrise pentru tomată. Plantele de *S. dulcamara* care nu se ofilesc și se dezvoltă cu tulpina și rădăcina în apă pot prezenta o ușoară decolorare brună a țesutului vascular pe partea transversală a tulpinii sau pe părțile tulpinii aflate sub apă. În cazul în care se pune o tulpină tăiată în poziție verticală în apă, se pot observa fire de exsudat bacterian sau fire din țesutul vascular tăiat chiar în absența simptomelor de ofilire.

2. **Teste de selecție rapidă**

Testele de selecție rapidă ușurează diagnosticul prezumtiv, dar nu sunt esențiale. A se folosi unul sau mai multe dintre următoarele teste validate:

2.1. Testul eliminării exsudatului bacterian din tulpină

(a se vedea secțiunea VI.A.1).

2.2. Detectarea granulelor de poli-β-hidroxibutirat (PHB)

Granulele tipice de PHB din celulele de *R. solanacearum* pot fi vizualizate prin colorarea cu albastru de Nil A sau cu negru de Sudan B (a se vedea secțiunea VI.A.2) a frotiurilor de exsudat bacterian din țesutul infectat fixate la căldură pe o lamă de microscop.

2.3. Testul de sero-aglutinare

(a se vedea secțiunea VI.A.3).

2.4. Alte teste

Alte teste de selecție rapidă sunt testul IF (a se vedea secțiunea VI.A.5), testul FISH (a se vedea secțiunea VI.A.7), testele ELISA (a se vedea secțiunea VI.A.8) și testele PCR (a se vedea secțiunea VI.A.6).

3. **Procedura de izolare**

(a) Se îndepărtează exsudatul sau secțiunile de țesut decolorat din inelul vascular al tuberculului de cartof sau din căile vasculare ale tulpinii plantei de cartof, de tomată sau de alte plante gazdă ofilite. Se pune în suspensie, într-un volum mic de apă distilată sterilă sau într-un tampon fosfat de 50 mM (apendicele 4). Se lasă cinci-zece minute pe masă.

(b) Se prepară o serie de diluții zecimale ale suspensiei.

(c) Se transferă 50-100 µl de suspensie și de diluții într-un mediu nutritiv general (NA, YPGA și SPA; a se vedea apendicele 2) și/sau în mediul de tetrazoliu Kelman (apendicele 2) și/sau în mediul selectiv validat (de exemplu, SMSA; a se vedea apendicele 2). Se întinde sau se prepară în linii cu o tehnică de diluare-însămânțare corespunzătoare. În cazul în care se consideră util, se prepară plăci din cutii Petri separate cu o suspensie de celule diluate din sușa virulentă biovar 2 de *R. solanacearum* drept control pozitiv.

(d) Se incubează plăcile timp de 2-6 zile la 28 °C.

— În mediul nutritiv general, izolările virulente de *R. solanacearum* dezvoltă colonii fluide, neregulate, plate, albicioase, deseori cu verticile caracteristice în centru. Formele avirulente de *R. solanacearum* formează mici colonii rotunjite, nefluide, untoase, de culoare albicioasă uniformă.

— În mediul tetrazolic Kelman și în mediul SMSA, verticile sunt de culoare roșu intens. Formele avirulente de *R. solanacearum* dezvoltă mici colonii rotunjite, untoase, de culoare uniformă roșu închis.

4. **Teste de identificare a *R. solanacearum***

Testele care permit identificarea izolărilor prezumtive de *R. solanacearum* sunt prevăzute în secțiunea VI.B.

SECȚIUNEA III

1. **Metode detaliate pentru detectarea și identificarea *Ralstonia solanacearum* în eșantioanele de tuberculi de cartof asimptomatici**

1.1. Pregătirea eșantionului

Note:

— Mărimea standard a eșantionului este de 200 de tuberculi pe test. O procedură mai intensivă de eșantionare implică efectuarea mai multor teste pe eșantioane de această mărime. Un număr mai mare de tuberculi într-un eșantion va duce la o inhibare sau o interpretare dificilă a rezultatelor. Cu toate acestea, procedura se poate aplica cu ușurință eșantioanelor cu mai puțin de 200 tuberculi în cazul în care este disponibil un număr mai mic de tuberculi.

— Validarea tuturor metodelor de detectare descrise în continuare se bazează pe efectuarea unor teste pe eșantioane de două sute de tuberculi.

— Extractul de cartof descris în continuare poate fi, de asemenea, utilizat pentru detectarea prezenței bacteriei responsabile de ofilirea bacteriană a cartofului, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Operațiuni de pretratare care pot fi efectuate înainte de pregătirea eșantionului:

(a) Se incubează eșantioanele la 25-30 °C pe parcursul unei perioade de până la două săptămâni înainte de efectuarea testelor pentru a încuraja multiplicarea eventualelor populații de *R. solanacearum*.

(b) Se spală tuberculii, între fiecare eșantion, cu dezinfectanți (compuși clorurați în cazul în care testul PCR trebuie folosit pentru a elimina ADN patogen) și detergenți corespunzători. Tuberculii se usucă la aer. Această procedură de spălare este deosebit de utilă (dar nu obligatorie) pentru eșantioanele cu particule de sol excedentare și în cazul în care trebuie efectuat un test PCR sau o procedură de izolare directă.

1.1.1. Cu un scalpel sau un cuțit pentru legume curat și dezinfectat se îndepărtează coaja de la talonul (stolonul) fiecărui tubercul, astfel încât să fie vizibil țesutul vascular. Se taie cu atenție un miez mic de țesut vascular de la talon. Cantitatea de țesut nevascular trebuie redusă la minimum (a se vedea website-ul http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

Notă: Se separă tuberculii (în putrefacție) cu simptome de «putregai brun» și se testează separat.

În cazul în care, la îndepărtarea miezului de talon, se observă simptome de ofilire bacteriană, trebuie să se întreprindă o examinare vizuală a tuberculului respectiv și acesta trebuie tăiat lângă talon. Orice tubercul tăiat care prezintă simptome suspecte trebuie păstrat timp de cel puțin două zile la temperatura ambiantă pentru a permite formarea unui strat de suber, iar apoi depozitat la o temperatură de refrigerare (între 4 și 10 °C) în condiții de carantină corespunzătoare. Toți tuberculii, inclusiv cei cu simptome suspecte, trebuie păstrați în conformitate cu anexa III.

1.1.2. Se colectează miezurile taloanelor în recipiente de unică folosință neutilizate care pot fi închise și/sau sigilate (în cazul în care recipientele sunt refolosite, ele trebuie spălate și dezinfectate cu compuși clorinați). Este preferabil ca taloanele să fie prelucrate de îndată. În cazul în care nu este posibil, acestea se depozitează în recipiente, fără adăugarea unui tampon, pentru cel mult 72 ore în frigider și cel mult 24 ore la temperatura ambiantă.

Se prelucrează taloanele printr-una dintre următoarele proceduri:

(a) Se acoperă taloanele cu un volum suficient (circa 40 ml) de tampon de extracție (apendicele 4) și se introduc într-un agitator rotativ (50-100 turații/minut) timp de 4 ore la o temperatură mai mică de 24 °C sau la o temperatură de refrigerare timp de 16-24 ore

sau

(b) Taloanele se omogenizează cu un volum suficient (circa 40 ml) de tampon de extracție (apendicele 4) într-un mixer (de exemplu, Waring sau Ultra Thurax) sau se mărunțesc într-un sac de macerare de unică folosință sigilat (de exemplu, sac Stomacher sau de tip «Bioreba strong gauge polythene» de 150 mm × 250 mm sterilizat prin radiații) cu ajutorul unui ciocan de cauciuc sau al unui dispozitiv de măcinare corespunzător (de exemplu, Homex).

Notă: Riscul de contaminări încrucișate ale eșantioanelor este considerabil în cazul în care eșantioanele sunt omogenizate într-un mixer. A se lua măsuri de precauție pentru a evita producerea de aerosol sau scurgeri în timpul procesului de extracție. A se utiliza palete de mixer și recipiente proaspăt sterilizate pentru fiecare eșantion. La efectuarea testului PCR, a se evita transferul de ADN pe recipientele sau dispozitivele de măcinare. În cazul în care se recurge la testul PCR, se recomandă măcinarea în saci de unică folosință și utilizarea de tuburi de unică folosință.

1.1.3. Se decantează supranatantul. În cazul în care acesta este prea tulbure, se filtrează printr-o centrifugare la viteză mică (la 180 g maximum timp de zece minute, la o temperatură de 4-10 °C) sau printr-o filtrare în vid (40-100 µm), spălând filtrul cu un tampon de macerare suplimentar (10 ml).

1.1.4. Se centrifughează maceratul decantat la 7 000 g timp de 15 minute (sau la 10 000 g timp de zece minute) la o temperatură de 4-10 °C și se îndepărtează supranatantul fără a deranja extractul concentrat.

1.1.5. Se face o nouă suspensie a extractului concentrat în 1,5 ml tampon concentrat (apendicele 4). Se folosesc 500 µl pentru a testa *R. solanacearum*, 500 µl pentru *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* și 500 µl pentru referință. Se adaugă glicerol steril la concentrația finală de 10-25 % (volum) la 500 µl de alicote de referință și la alicota de testare rămasă, se omogenizează în vortex și se depozitează la o temperatură situată între – 16 și – 24 °C (săptămâni) sau între – 68 și – 86 °C (luni). Alicotele de testare se păstrează în timpul testelor la o temperatură de 4-10 °C.

Nu se recomandă congelările și decongelările repetate.

În cazul în care extrasele trebuie transportate, livrarea trebuie efectuată într-o geantă frigorifică în termen de 24 ore.

1.1.6. Este absolut necesar ca toate controalele pozitive și eșantioanele de *R. solanacearum* să fie prelucrate separat pentru a evita orice contaminare. Această condiție se aplică atât pentru lamele de imunofluorescență, cât și pentru ansamblul testelor.

1.2. Teste

A se vedea diagrama și descrierea testelor și a protocoalelor optimizate în apendicele corespunzătoare:

Izolare selectivă (a se vedea secțiunea VI.A.4)

Testul IF (a se vedea secțiunea VI.A.5)

Testele PCR (a se vedea secțiunea VI.A.6)

Testul FISH (a se vedea secțiunea VI.A.7)

Testele ELISA (a se vedea secțiunea VI.A.8)

Testul biologic (a se vedea secțiunea VI.A.9)

2. **Metode detaliate pentru detectarea și identificarea *R. solanacearum* în eșantioanele de plante gazdă de cartof și tomată și de alte plante gazdă asimptomatice**

2.1. Pregătirea eșantionului

Notă: Pentru detectarea populațiilor latente de *R. solanacearum*, se recomandă testarea unor eșantioane compozite. Procedura poate fi aplicată cu ușurință eșantioanelor compozite care conțin până la două sute de bucăți de tulpină. În cazul în care se efectuează studii, acestea trebuie bazate pe un eșantion reprezentativ din punct de vedere statistic al populației vegetale în cauză.

2.1.1. Se colectează bucăți de tulpină de 1-2 cm într-un recipient steril închis în conformitate cu următoarele proceduri de prelevare:

Plantule de tomată de pepinieră: cu ajutorul unui cuțit curat și dezinfectat se taie o bucată de 1 cm la baza fiecărei tulpini, chiar deasupra nivelului solului.

Plante de tomată cultivate în seră sau în câmp: cu ajutorul unui cuțit curat și dezinfectat se îndepărtează lăstarul cel mai de jos al fiecărei plante tăind chiar deasupra joncțiunii cu tulpina principală. Se îndepărtează o bucată de 1 cm de la baza fiecărui lăstar lateral.

Alte plante gazdă: cu ajutorul unui cuțit sau al unui foarfece de grădină curat și dezinfectat se taie o bucată de 1 cm de la baza fiecărei tulpini, chiar deasupra nivelului solului. În cazul *S. dulcamara* sau al altor plante gazdă care cresc în apă, se taie bucăți de 1-2 cm din tulpinile care se găsesc sub apă sau din stolonii cu rădăcini acvatice.

În caz de prelevare dintr-un anumit loc, se recomandă să se testeze un eșantion reprezentativ din punct de vedere statistic de cel puțin zece plante pe punct de prelevare a fiecărei buruieni gazdă potențiale. Detectarea agentului patogen se face în modul cel mai fiabil la sfârșitul primăverii, vara și toamna, deși infecțiile naturale pot fi detectate pe tot parcursul anului la plantele perene de *Solanum dulcamara* care cresc în apă. Gazdele cunoscute sunt plantele spontane de cartof, *Solanum dulcamara, S. nigrum, Datura stramonium* și alți membri ai familiei solanaceelor. *Pelargonium* spp. și *Portulaca oleracea* sunt, de asemenea, plante gazdă. Printre anumite buruieni europene care pot găzdui sușe virulente biovar 2, rasa 3 de *R. solanacearum* în rădăcini și/sau rizosfere în condiții de mediu specifice se numără *Atriplex hastata, Bidens pilosa, Cerastium glomeratum, Chenopodium album, Eupatorium cannabinum, Galinsoga parviflora, Ranunculus scleratus, Rorippa* spp., *Silene alba, S. nutans, Tussilago farfarra* și *Urtica dioica*.

Notă: În această etapă se poate efectua examinarea vizuală a simptomelor interne (colorație vasculară sau exsudat bacterian). Se separă orice bucată de tulpină cu simptome și se testează în mod separat (a se vedea secțiunea II).

2.1.2. Se efectuează o dezinfectare scurtă a bucăților cu etanol de 70 % și se usucă de îndată cu ajutorul hârtiei absorbante. Apoi, se prelucrează bucățile de tulpină în conformitate cu una dintre următoarele proceduri:

(a) se acoperă cu un volum suficient (circa 40 ml) de tampon de extracție (apendicele 4) și se introduc într-un agitator rotativ (50-100 turații/minut) timp de patru ore la o temperatură mai mică de 24 °C sau la o temperatură de refrigerare timp de 16-24 ore sau

(b) bucățile se zdrobesc de îndată într-un sac de macerare rezistent (de exemplu, Stomacher sau Bioreba) cu un volum corespunzător de tampon de extracție (apendicele 4) cu ajutorul unui ciocan de cauciuc sau al unui dispozitiv de măcinare corespunzător (de exemplu, Homex). În cazul în care acest lucru nu este posibil, bucățile se păstrează, fără a depăși 72 ore la temperatură de refrigerare sau 24 ore la temperatura ambiantă.

2.1.3. Se decantează supranatantul după o sedimentare de 15 minute.

2.1.4. De obicei, nu este necesară o limpezire suplimentară a extractului sau a concentratului decantat, dar poate fi realizată prin filtrare și/sau centrifugare în conformitate cu metoda prevăzută la secțiunea III.1.1.3-1.1.5.

2.1.5. Se împarte extractul eșantionului inițial sau concentrat în două părți egale. Se păstrează jumătate la o temperatură de 4-10 °C pe parcursul testului și se conservă cealaltă jumătate cu 10-25 % (volum) de glicerol steril la o temperatură situată între – 16 și – 24 °C (săptămâni) sau între – 68 și – 86 °C (luni) în cazul în care este necesar un test suplimentar.

2.2. Teste

A se vedea diagrama și descrierea testelor și protocoalelor optimizate în apendicele corespunzătoare:

Izolarea selectivă (a se vedea secțiunea VI.A.4)

Testul IF (a se vedea secțiunea VI.A.5)

Testele PCR (a se vedea secțiunea VI.A.6)

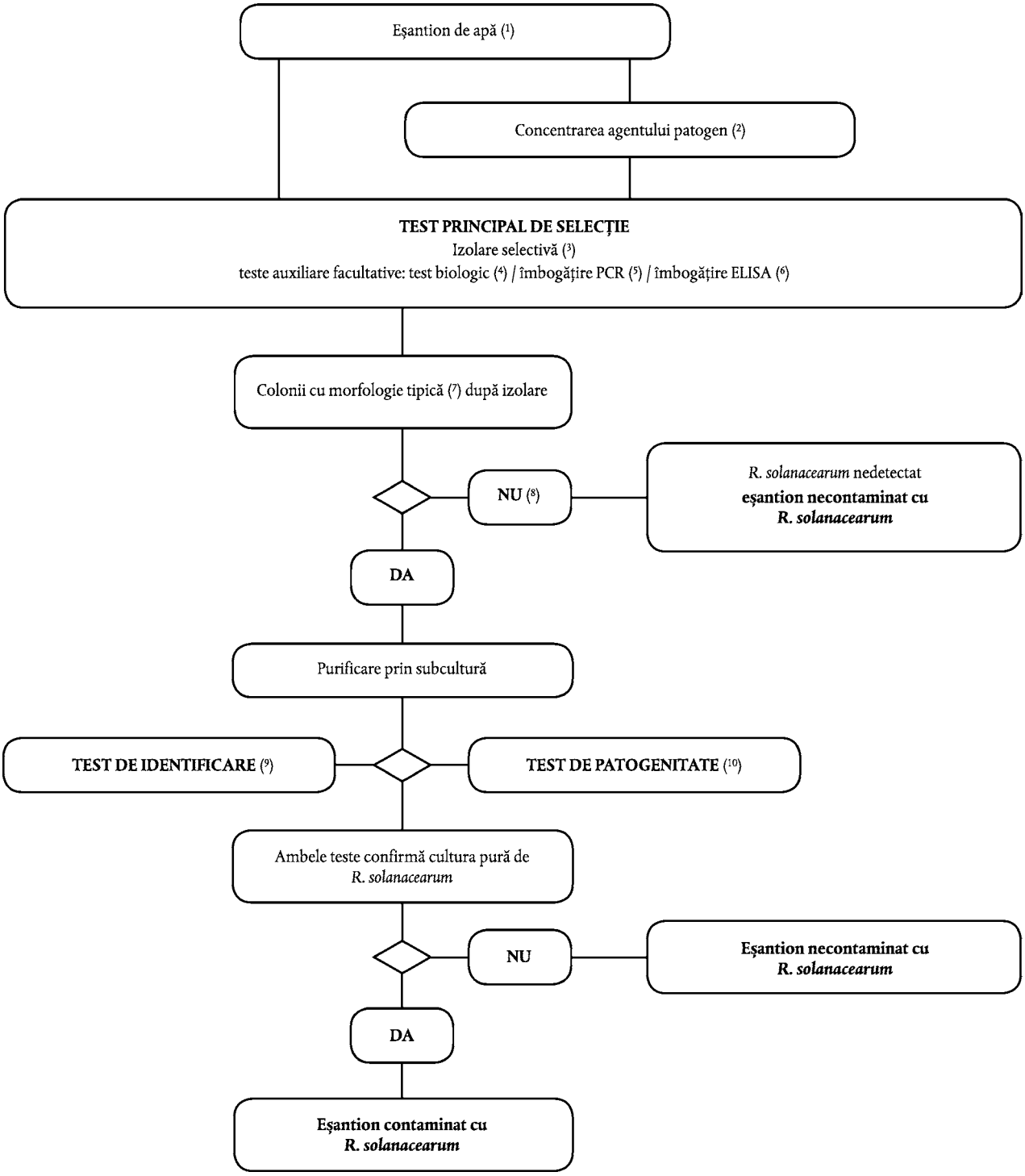
Testul FISH (a se vedea secțiunea VI.A.7)

Testele ELISA (a se vedea secțiunea VI.A.8)

Testul biologic (a se vedea secțiunea VI.A.9)

SECȚIUNEA IV

1. **Procedură pentru detectarea și identificarea *R. solanacearum* în apă**



([1]) A se vedea secțiunea IV.2.1 pentru procedurile de prelevare recomandate.

([2]) Metodele de concentrare a agentului patogen sunt descrise în secțiunea IV.2.1. Concentrarea sporește populațiile agentului patogen și ale bacteriilor saprofite concurente și este recomandată numai în cazul în care nu determină inhibarea testului de izolare.

([3]) Testul de izolare selectivă este descris în secțiunea VI.A.4.

([4]) Testul biologic este descris în secțiunea VI.A.9.

([5]) Metodele de îmbogățire PCR sunt descrise în secțiunile VI.A.4.2 și VI.A.6.

([6]) Metodele de îmbogățire ELISA sunt descrise în secțiunile VI.A.4.2 și VI.A.8.

([7]) Morfologia tipică a coloniei este descrisă în secțiunea II.3.d.

(8) Cultivarea riscă să eșueze din cauza concurenței sau a efectului inhibator al bacteriilor saprofite. În cazul în care populațiile mari de saprofite sunt suspectate că ar putea afecta fiabilitatea izolării, testele de izolare trebuie reîncepute după diluarea eșantionului în apă sterilă.

([9]) Identificarea fiabilă a culturilor pure de izolări prezumtive de R. solanacearum necesită efectuarea testelor descrise la secțiunea VI.B.

([10]) Testul de patogenitate este descris în secțiunea VI.C.

2. **Metode pentru detectarea și identificarea *R. solanacearum* în apă**

Principiu

Procedura de detectare validată descrisă în prezenta secțiune se aplică pentru detectarea agentului patogen în eșantioanele de apă de suprafață și poate fi folosită, de asemenea, pentru a testa eșantioanele de efluenți proveniți din prelucrarea cartofilor sau efluenții de ape reziduale. Cu toate acestea, trebuie reținut faptul că sensibilitatea prevăzută a detectării va varia în funcție de substrat. Sensibilitatea testului de izolare este deranjată de populațiile de bacterii saprofite concurente care sunt, în general, mult mai numeroase în efluenții proveniți din prelucrarea cartofilor și în efluenții de ape reziduale decât în apele de suprafață. În timp ce procedura descrisă în continuare trebuie să detecteze numai 10^3 celule/l în apele de suprafață, sensibilitatea detectării în efluenții proveniți din prelucrarea cartofilor sau în efluenții de ape reziduale poate fi mult mai slabă. Din acest motiv, se recomandă testarea efluenților după eventualele tratamente de purificare (de exemplu, sedimentare sau filtrare) pe parcursul cărora se reduc populațiile de bacterii saprofite. Limitările sensibilității procedurii de testare trebuie avute în vedere atunci când se evaluaeaza fiabilitatea rezultatelor negative obținute, după caz. Deși această procedură a fost efectuată cu succes în studiile destinate să stabilească prezența sau absența agentului patogen în apele de suprafață, limitările sale trebuie luate în considerare atunci când este utilizată în lucrări asemănătoare privind efluenții proveniți din prelucrarea cartofilor sau efluenții de ape reziduale.

2.1. Pregătirea eșantionului

Note:

— Detectarea *R. solanacearum* în apele de suprafață se face în mod mai fiabil la sfârșitul primăverii, vara și toamna, atunci când temperatura apei este mai mare de 15 °C.

— Faptul de a reîncepe prelevarea în momente diferite pe parcursul perioadei menționate anterior în punctele de prelevare desemnate va spori fiabilitatea detectării reducând consecințele variațiilor climatice.

— Trebuie să se țină seama de consecințele ploilor abundente și ale geografiei cursului apei pentru a evita efectele de diluare considerabile care pot disimula prezența agentului patogen.

— A se preleva eșantioane de apă de suprafață în apropierea plantelor gazdă în cazul în care aceste plante gazdă sunt prezente.

2.1.1. În punctele de prelevare selecționate, eșantioanele de apă se colectează prin umplerea unor tuburi sau sticle sterile de unică folosință la o adâncime, atunci când este posibil, mai mare de 30 cm și la o distanță maximă de 2 m de la mal. Pentru efluenții proveniți din prelucrarea cartofilor sau efluenții de ape reziduale, se colectează eșantioane în punctul de deversare a efluenților. Mărimea recomandată a eșantioanelor atinge 500 ml pe punct de prelevare. În cazul în care se preferă eșantioanele mai modeste, se recomandă prelevarea eșantioanelor cel puțin în trei reprize pe punct de prelevare, fiecare eșantion constând din două subeșantioane duplicate de cel puțin 30 ml. Pentru un studiu intensiv, se selecționează cel puțin trei puncte de prelevare pentru 3 km de curs al apei și se asigură prelevarea, de asemenea, din afluenții cursului de apă.

2.1.2. Se transportă eșantioanele în condiții de întuneric și la temperatură joasă (4-10 °C) și se testează pe parcursul a 24 ore.

2.1.3. La nevoie, fragmentul bacterian poate fi concentrat prin una dintre următoarele metode:

(a) Se centrifughează 30-50 ml de subeșantioane la 10 000 g timp de zece minute (sau la 7 000 g timp de 15 minute), preferabil la o temperatură de 4-10 °C, se îndepărtează supranatantul și se face o nouă suspensie a extractului concentrat în 1 ml de tampon concentrat (apendicele 4).

(b) Filtrare pe membrană (dimensiunea minimă a porilor de 0,45 µm) urmată de spălarea filtrului în 5-10 ml de tampon concentrat și reținerea soluțiilor de spălare. Această metodă este potrivită pentru volume mari de apă cu conținut mic de saprofite.

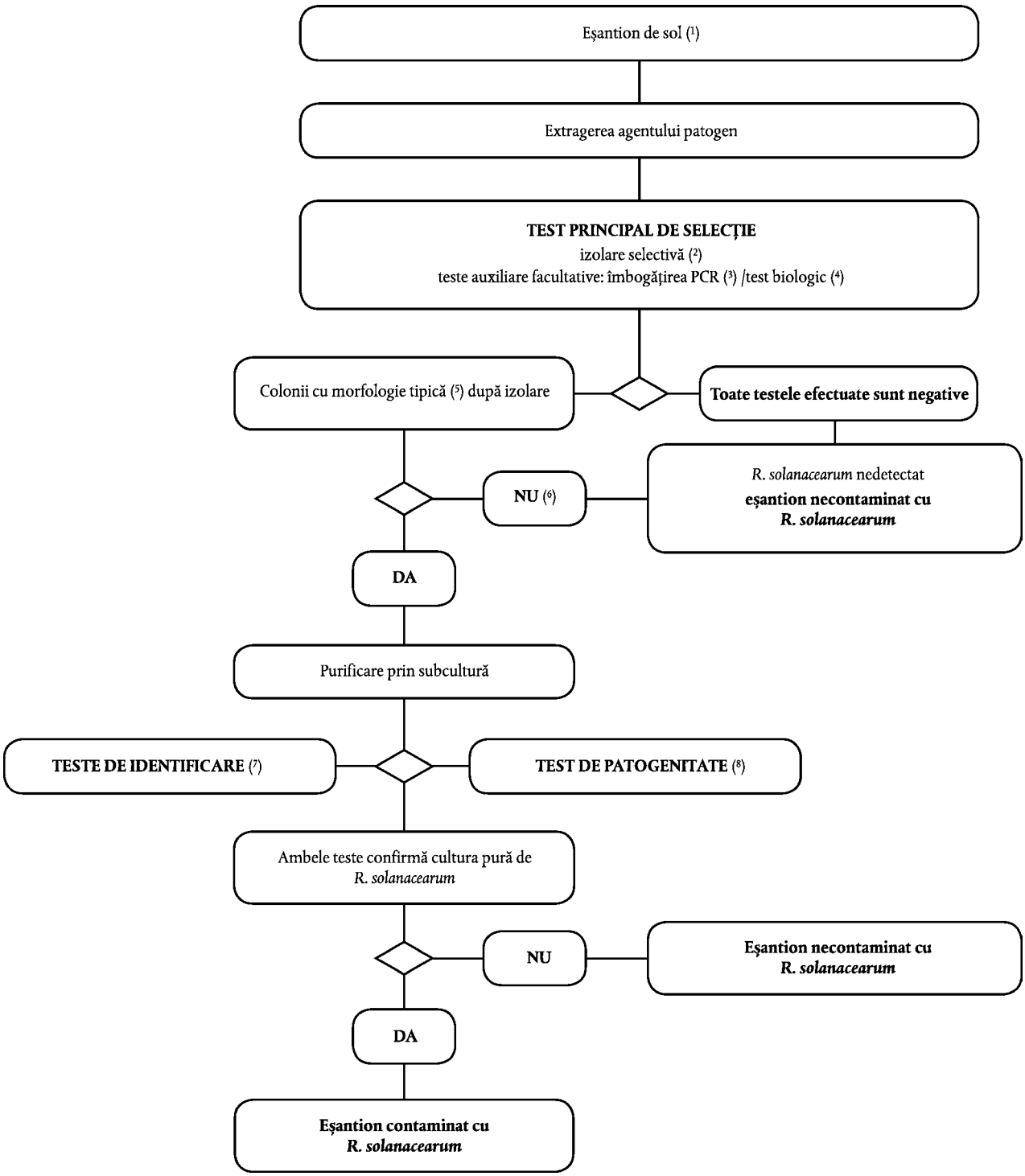
În general, concentrarea nu se recomandă pentru eșantioanele de efluenți proveniți din prelucrarea cartofilor sau de efluenți de ape reziduale, dat fiind faptul că populațiile mai mari de bacterii saprofite concurente vor avea un efect inhibitor asupra detectării *R. solanacearum*.

2.2. Teste

A se vedea diagrama și descrierea testelor în apendicele corespunzătoare.

SECȚIUNEA V

1. **Procedură pentru detectarea și identificarea *R. solanacearum* în sol**



(1) A se vedea secțiunea V.2.1 pentru procedurile de prelevare recomandate.

(2) Testul de izolare selectivă este descris în secțiunea VI.A.4.

(3) Metodele de îmbogățire PCR sunt descrise în secțiunile VI.A.4.2 și VI.A.6.

(4) Testul biologic este descris în secțiunea VI.A.9.

(5) Morfologia tipică a coloniei este descrisă în secțiunea II.3.d.

(6) Cultivarea riscă să eșueze din cauza concurenței sau a efectului inhibitor al bacteriilor saprofite. În cazul în care populațiile mari de saprofite sunt suspectate că ar putea afecta fiabilitatea izolării, testele de izolare trebuie reîncepute după o nouă diluare a eșantionului.

(7) Identificarea fiabilă a culturilor pure prezumtive de *R. solanacearum* necesită efectuarea testelor descrise la secțiunea VI.B.

(8) Testul de patogenitate este descris în secțiunea VI.C.

2. **Metode pentru detectarea și identificarea *R. solanacearum* în sol**

Principii

Procedura de detectare validată descrisă în prezenta secțiune se aplică pentru detectarea agentului patogen în eșantioanele de sol, dar poate fi, de asemenea, utilizată pentru a testa eșantioanele de deșeuri solide provenite din prelucrarea cartofilor sau a nămolului de epurare. Cu toate acestea, trebuie remarcat faptul că aceste metode nu sunt destul de sensibile pentru a garanta detectarea populațiilor de *R. solanacearum* cu densitate mică sau dispersate inegal care ar putea apărea în eșantioanele infectate în mod natural cu aceste substraturi.

Sensibilitatea limitată a acestei proceduri de testare trebuie avută în vedere la evaluarea fiabilității rezultatelor negative obținute și, de asemenea, la utilizarea sa în studiile destinate să stabilească prezența sau absența agentului patogen în soluri sau în nămol. Cel mai fiabil test de detectare a prezenței agentului patogen în solul unui câmp este plantarea unei plante gazdă sensibile și supravegherea infectării eventuale a acesteia, însă nici această metodă nu va permite detectarea unui nivel slab de contaminare.

2.1. Pregătirea eșantionului

2.1.1. Prelevarea solului din câmp trebuie să respecte standardele de bază utilizate pentru prelevarea nematozilor. Se colectează 0,5-1 kg de sol per eșantion în 60 puncte pe o suprafață de 0,3 ha la o adâncime de 10-20 cm (sau dintr-o grilă de 7 × 7 m). În cazul în care se suspectează prezența agentului patogen, se mărește numărul de puncte de colectare la 120 pe o suprafață de 0,3 ha. Se păstrează eșantioanele, înainte de testare, la o temperatură de 12-15 °C. Se colectează, în total, 1 kg de nămol provenit din prelucrarea cartofilor și nămol de epurare în locurile care reprezintă volumul total de nămol de testat. Se amestecă bine fiecare eșantion înainte de testare.

2.1.2. Se împart eșantioanele în subeșantioane de 10-25 g de sol sau de nămol cu ajutorul unui agitator rotativ (250 turații/minut) într-un tampon de extracție de 60-150 ml (apendicele 4) timp de două ore cel mult. După caz, pentru a favoriza dispersia, se adaugă 0,02 % de Tween 20 steril și 10-20 g de pietriș steril.

2.1.3. Suspensia se păstrează, în timpul testului, la 4 °C.

2.2. Teste

A se vedea diagrama și descrierea testelor în apendicele corespunzătoare.

SECȚIUNEA VI

Protocoale optimizate pentru detectarea și identificarea *R. Solanacearum*

A. *DIAGNOSTIC ȘI TESTE DE DETECTARE*

1. **Testul eliminării exsudatului bacterian din tulpină**

Prezența *R. solanacearum* în tulpini ofilite de cartof, de tomate sau de alte plante gazdă poate fi evaluată prin următorul test simplu prezumtiv: se secționează tulpina chiar deasupra nivelului solului. Se pune extremitatea tăiată într-un tub cu apă curată. După câteva minute, se observă scurgeri spontane și caracteristice de fire de exsudat bacterian din fasciculele vasculare tăiate.

2. **Detectarea granulelor de poli-β-hidroxibutirat**

1. Se prepară un frotiu din exsudatul bacterian scurs din țesutul infectat pe o lamelă de microscop sau se prepară un frotiu dintr-o cultură de 48 ore pe bază de YPGA sau SPA (apendicele 2).

2. Se prepară frotiuri de control pozitiv din sușa biovar 2 de *R. solanacearum* și, în cazul în care se consideră necesar, un frotiu de control negativ dintr-un PHB negativ cunoscut.

3. Se lasă la uscat și se trece rapid partea inferioară a fiecărei lamele de câteva ori prin flacără până la fixarea frotiului.

4. Se colorează frotiul preparat cu albastru de Nil sau negru de Sudan și se examinează la microscop după cum urmează.

Testul cu albastru de Nil

(a) Fiecare lamelă se scufundă într-o soluție apoasă 1 % de albastru de Nil A. Se incubează zece minute la 55 °C.

(b) Se scurge soluția colorantă. Se spală rapid sub un firișor de apă curgătoare. Excesul de apă se îndepărtează cu hârtie absorbantă.

(c) Frotiul se scufundă într-o soluție apoasă de acid acetic de 8 % și se incubează un minut la temperatura ambiantă.

(d) Se spală rapid sub un firișor de apă curgătoare. Excesul de apă se îndepărtează cu hârtie absorbantă.

(e) Se umezește cu o picătură de apă și se aplică o lamelă de acoperire.

(f) Se examinează frotiul colorat la un microscop cu epifluorescență sub un film de ulei de 450 nm, la un grosisment de 600-1 000, folosind un obiectiv de imersiune în ulei sau în apă.

(g) Se observă fluorescența portocalie strălucitoare a granulelor PHB. De asemenea, se observă la lumină normală pentru a avea certitudinea că granulele sunt intracelulare și că morfologia celulei este tipică pentru *R. solanacearum*.

Testul cu negru de Sudan

(a) Fiecare lamelă se scufundă într-o soluție de 0,3 % negru de Sudan B în 70 % etanol și se incubează zece minute la temperatura ambiantă.

(b) Se scurge soluția colorantă și se spală rapid cu apă curgătoare. Se îndepărtează excesul de apă cu hârtie absorbantă.

(c) Lamelele se trec rapid prin xilen brut și se usucă cu hârtie absorbantă. *Atenție! xilenul este un produs periculos. Luați măsurile de precauție necesare și lucrați într-o hotă chimică.*

(d) Se scufundă lamelele în soluție apoasă de safranin de 0,5 % și se lasă zece secunde la temperatura ambiantă. *Atenție! Safraninul este un produs periculos. Luați măsurile de precauție necesare și lucrați într-o hotă chimică.*

(e) Se spală sub un firișor de apă curgătoare. Se usucă cu hârtie absorbantă și se reacoperă cu o lamelă.

(f) Se examinează frotiul colorat la un microscop optic utilizând lumina transmisă sub imersie în ulei la un grosisment de 1 000.

(g) Se observă granulele de PHB din celulele de *R. solanacearum* care se colorează în albastru-negru. Membrana celulară se colorează în roz.

3. **Teste de sero-aglutinare**

Aglutinarea celulelor de *R. solanacearum* în exsudatul bacterian sau în extractele de țesuturi simptomatice se observă cel mai bine folosind anticorpi validați (a se vedea apendicele 3) etichetați cu marcatori colorați corespunzători, precum celulele de *Staphylococcus aureus* roșu sau particule de latex colorate. În caz de utilizare a unui material disponibil în comerț (a se vedea apendicele 3), se urmează instrucțiunile producătorului. În caz contrar, se urmează procedura descrisă în continuare:

(a) Se amestecă picăturile unei suspensii de anticorpi și de exsudat bacterian marcate (circa 5 µl în fiecare caz) pe ferestrele lamelor de testare cu multe godeuri.

(b) Se prepară frotiuri de control pozitiv și negativ din suspensii biovar 2 de *R. solanacearum* și dintr-o suș heterologă.

(c) Se observă aglutinarea în eșantioanele pozitive după o amestecare ușoară timp de cincisprezece secunde.

4. **Izolarea selectivă**

4.1. Însămânțare pe mediu selectiv

Notă: Înainte de aplicarea acestei metode pentru prima dată, se efectuează teste preliminarii pentru a garanta o detectare reproductibilă a 10^3-10^4 celule care formează colonii de *R. solanacearum* pe ml adăugat la extractele din eșantioanele care au avut rezultate negative la testele anterioare.

Se folosește un mediu selectiv validat corespunzător, de exemplu, SMSA (modificat de Elphinstone *et al.*, 1996; a se vedea apendicele 2).

De asemenea, trebuie diferențiat *R. solanacearum* de alte bacterii care pot dezvolta colonii în mediul respectiv. În plus, coloniile de *R. solanacearum* pot prezenta o morfologie atipică în cazul în care plăcile sunt suprapopulate sau în cazul în care sunt, de asemenea, prezente bacterii antagoniste. În cazul în care se suspectează efectele de concurență sau de antagonism, eșantionul trebuie testat din nou utilizând o metodă de testare diferită.

Cea mai mare sensibilitate de detectare, în cadrul acestei metode, poate fi atinsă în cazul în care se folosesc extracte de eșantioane proaspăt preparate. Cu toate acestea, metoda se aplică, de asemenea, utilizărilor de extracte păstrate sub glicerol la o temperatură cuprinsă între – 68 și – 86 °C.

Se prepară, pentru control pozitiv, diluții zecimale de suspensie de 10^6 ufc/ml dintr-o sușă virulentă biovar 2 de *R. solanacearum* (de exemplu, NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857). Pentru a evita orice posibilitate de contaminare, controalele pozitive se prepară complet separat de eșantioanele de testat.

Pentru fiecare lot de mediu selectiv proaspăt pregătit, acesta trebuie testat pentru a vedea dacă este propice înmulțirii agentului patogen înainte de a-l utiliza pentru testarea eșantioanelor de rutină.

Materialul de control se testează în același mod ca și eșantioanele.

4.1.1. Testul se efectuează cu ajutorul unei tehnici corespunzătoare prin diluare și însămânțare cu scopul de a asigura diluarea întregii populații care formează colonii de saprofite. Se folosesc 50-100 µl din fiecare eșantion de extract și fiecare diluție.

4.1.2. Plăcile se incubează la 28 °C. Citirea plăcilor se face după 48 ore, iar apoi zilnic pe o perioadă de până la șase zile. Coloniile tipice de *R. solanacearum* în mediul nutritiv SMSA sunt de culoare alb-lăptos, plate, neregulate și fluide, iar după trei zile de incubare dezvoltă o colorație roz spre roșu-sângeriu în centru, prezentând spirale sau striații interne sau verticile (a se vedea website-ul http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

Notă: Uneori, în acest mediu se formează colonii atipice de *R. solanacearum*. Ele pot fi mici, în întregime de culoare roșie și nefluide sau parțial fluide fiind, prin urmare, greu de deosebit de bacteriile saprofite care formează colonii.

4.1.3. Coloniile prezumtive de *R. solanacearum* se purifică după însămânțare sau diluare și însămânțare într-un mediu nutritiv general pentru a obține colonii izolate (a se vedea apendicele 2).

4.1.4. Culturile pot fi păstrate pe termen scurt în apă sterilă (pH 6-8, fără clor) la temperatura ambiantă și în întuneric sau pe termen lung într-un mediu crioprotector corespunzător între – 68 și – 86 °C sau liofilizate.

4.1.5. Se identifică culturile prezumtive (a se vedea secțiunea VI.B) și se efectuează un test de patogenitate (a se vedea secțiunea VI.C).

Interpretarea rezultatelor testului de diluare-însămânțare

Testul de diluare-însămânțare este negativ atunci când după șase zile nu sunt izolate colonii bacteriene sau atunci când nu sunt izolate colonii caracteristice *R. solanacearum*, cu condiția să nu fie suspectată o inhibiție din cauza coloniilor unei alte bacterii și să fie găsite în controalele pozitive colonii caracteristice de *R. solanacearum*.

Testul de diluare-însămânțare este pozitiv atunci când sunt izolate colonii prezumtive de *R. solanacearum*.

4.2. Procedura de îmbogățire

A se utiliza un mediu de îmbogățire validat, precum mediul nutritiv modificat Wilbrink (a se vedea apendicele 2).

Această procedură poate fi folosită pentru a crește în mod selectiv populațiile de R. solanacearum *în extractele de eșantioane și pentru a ameliora sensibilitatea detectării. Procedura permite, de asemenea, diluarea inhibitorilor reacției PCR (1:100). Cu toate acestea, trebuie observat faptul că îmbogățirea* R. solanacearum *poate eșua din cauza concurenței sau antagonismului organismelor saprofite care sunt, de multe ori, îmbogățite simultan. În consecință, izolarea* R. solanacearum *în medii nutritive de cultură îmbogățite poate fi dificilă. De asemenea, întrucât populațiile de saprofite apropiate din punct de vedere serologic se pot înmulți, în cazul utilizării testului ELISA, se recomandă utilizarea de anticorpi monoclonali specifici în locul anticorpilor policlonali.*

4.2.1. Pentru îmbogățirea PCR, se transferă 100 µl de extract de eșantion în 10 ml de mediu nutritiv lichid de îmbogățire (apendicele 2) împărțit anterior în tuburi sau flacoane fără urme de ADN. Pentru îmbogățirea ELISA, se pot folosi proporții mai mari de mediu nutritiv lichid (de exemplu, 100 µl în 1,0 ml de mediu nutritiv lichid de îmbogățire).

4.2.2. Se incubează timp de 72 ore între 27 și 30 °C într-o cultură agitată sau statică fără a închide ermetic dopul tubului, pentru a permite aerisirea.

4.2.3. Se amestecă bine înainte de a se utiliza pentru testele ELISA sau PCR.

4.2.4. În testele anterioare, mediul nutritiv lichid de îmbogățire se tratează în același mod ca și eșantioanele.

Notă: În cazul în care se prevede o inhibare sau o îmbogățire a *R. solanacearum* din cauza populațiilor considerabile de anumite bacterii saprofite concurente, îmbogățirea extractelor de eșantioane până la centrifugare sau alte acțiuni de concentrare pot determina obținerea unor rezultate mai bune.

5. **Test de imunofluorescență**

Principiu

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

În cazul în care testul de imunofluorescență este utilizat ca principal test de selecție și rezultatul lui este pozitiv, trebuie efectuat un test de izolare, un test PCR sau un test FISH drept test secundar. În cazul în care testul de imunofluorescență este utilizat ca test secundar și rezultatul lui este pozitiv, analiza trebuie completată cu teste suplimentare după cum prevede diagrama funcțională.

Notă: Se utilizează o sursă validată de anticorpi de *R. solanacearum* (a se vedea website-ul http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Se recomandă stabilirea titrului pentru fiecare lot nou de anticorpi. Titrul se definește ca fiind cea mai mare diluție la care se obține o reacție optimă atunci când se testează o suspensie de 10^5-10^6 celule pe ml din sușa omologă de *R. solanacearum* folosind un conjugat corespunzător de izotiocianat de fluoresceină (FITC), în conformitate cu recomandările producătorului. Toate antiserurile policlonale validate au un titru de imunofluorescență de cel puțin 1: 2 000. La efectuarea testului, diluțiile de lucru ale anticorpilor trebuie să fie aproximativ egale sau egale cu cele ale titrului.

Testul trebuie efectuat cu extracte de eșantion proaspăt preparate. După caz, se pot folosi și extracte conservate în soluție de glicerol la o temperatură cuprinsă între – 68 °C și – 86 °C. Glicerolul poate fi separat de eșantion prin adăugarea a 1 ml de tampon concentrat (a se vedea apendicele 4), recentrifugarea timp de cincisprezece minute la 7 000 g și resuspendarea în același volum de tampon concentrat. Acest lucru este rareori necesar, mai ales atunci când eșantioanele sunt fixate de lame prin flambare.

Se prepară lame de control pozitiv separate dintr-o sușă omologă sau orice altă sușă de referință de *R. solanacearum* în suspensie în extract de cartof, după cum prevede apendicele 3 B și, facultativ, în tampon.

În cazul în care este posibil, ar trebui să se folosească drept control similar pe aceeași lamă țesut infectat în mod natural (conservat prin liofilizare sau congelare la o temperatură între – 16 și – 24 °C).

În calitate de control negativ, se pot folosi alicote de extracte de eșantioane care au dat rezultate negative la testele anterioare de detectare a *R. solanacearum*.

Materialele de control pozitiv și negativ standardizate disponibile pentru acest test sunt prevăzute în apendicele 3.

Se folosesc, pentru microscop, lame cu multe godeuri având, de preferință, zece ferestre cu diametru de cel puțin 6 mm.

Materialul de control se testează în același mod ca și eșantioanele.

5.1. Lamele de test se prepară folosind una dintre următoarele metode:

(i) Extracte concentrate cu relativ puțin amidon:

Se pipetează un volum standard (15 µl este adecvat unei ferestre de 6 mm diametru – volumul se mărește pentru ferestre cu diametru mai mare) dintr-o diluție de 1/100 de extract concentrat resuspendat în prima fereastră. Apoi, se pipetează un volum similar de extract concentrat nediluat (1/1) în ferestrele rămase din primul șir. Al doilea șir poate fi folosit ca duplicat sau pentru un al doilea eșantion, în conformitate cu cele indicate în figura 1.

(ii) Pentru alte extracte concentrate:

Se pregătesc diluții zecimale (1/10, 1/100) din extractul concentrat resuspendat în tamponul de concentrare. Se pipetează un volum standard (15 µl corespund unei ferestre de 6 mm diametru – volumul se mărește pentru ferestre cu un diametru mai mare) din extractul concentrat resuspendat și din fiecare diluție într-un șir de ferestre. Șirul rămas poate fi folosit ca duplicat sau pentru un al doilea eșantion, în conformitate cu cele indicate în figura 2.

5.2. Se lasă picăturile să se usuce la temperatura ambiantă sau prin încălzire la o temperatură de 40-45 °C. Celulele bacteriene se fixează pe lamă prin încălzire (cincisprezece minute la 60 °C), trecere prin flacără, cu 95 % etanol sau în conformitate cu instrucțiunile specifice ale furnizorilor de anticorpi.

În cazul în care este necesar, lamele fixate pot fi refrigerate sau depozitate într-o cutie de uscare pe perioada necesară (cel mult trei luni) înainte de un nou test.

5.3. Procedura testului de imunofluorescență

(i) În conformitate cu metoda de pregătire a lamelor de test indicată la punctul 5.1 (i):

Se prepară un set de diluții duble. Primul godeu ar trebui să fie de 1/2 din titru (T/2), celelalte fiind de 1/4 din titru (T/4), 1/2 din titru (T/2), titru (T) și de două ori titrul (2T).

(ii) În conformitate cu metoda de pregătire a lamelor de test indicată la punctul 5.1 (ii):

Se prepară diluția de lucru a anticorpilor în tampon pentru imunofluorescență. Diluția de lucru are efect asupra specificității.

Figura 1: Pregătirea lamei de test în conformitate cu punctele 5.1. (i) și 5.3. (i)

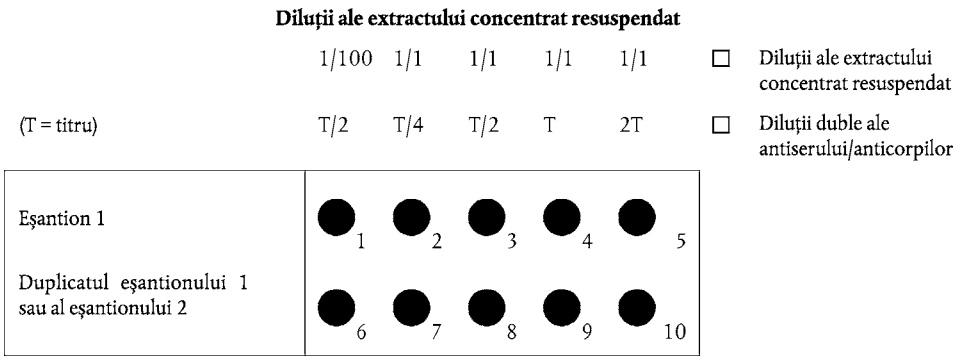
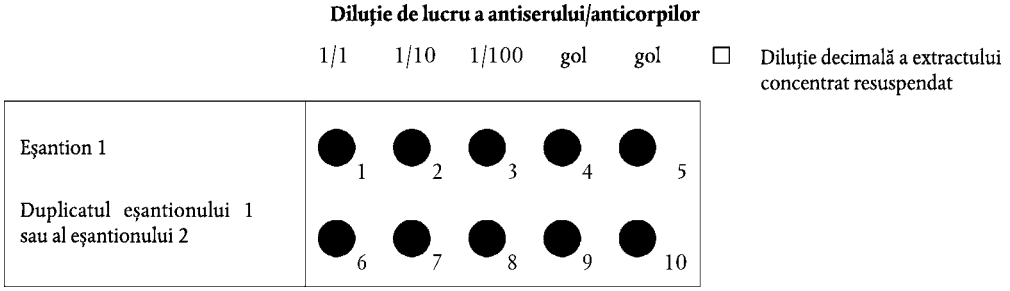


Figura 2: Pregătirea lamei de test în conformitate cu punctele 5.1. (ii) și 5.3. (ii)



5.3.1. Se aranjează lamele pe hârtie absorbantă umedă. Se acoperă complet fiecare fereastră de test cu diluția sau diluțiile de anticorpi. Cantitatea de antiser aplicat în fiecare fereastră trebuie să fie cel puțin echivalentă cu cantitatea de extract aplicată.

Următoarea procedură ar trebui aplicată în absența instrucțiunilor specifice ale furnizorilor de anticorpi:

5.3.2. Se incubează lamele pe hârtie umedă acoperite timp de 30 de minute la temperatura ambiantă (18-25 °C).

5.3.3. Se scutură picăturile de antiser de pe fiecare lamă și se clătesc lamele cu atenție cu un tampon pentru imunofluorescență. Se spală timp de cinci minute în soluție tampon IF-Tween (apendicele 4) și apoi în tampon IF. Se evită orice vaporizare sau scurgere care ar putea conduce la o contaminare încrucișată. Excesul de umezeală se îndepărtează cu grijă cu o sugativă.

5.3.4. Se așază lamele pe hârtie umedă. Se acoperă ferestrele de test cu diluția conjugatului FITC utilizat pentru determinarea titrării. Cantitatea conjugatului aplicată în ferestre trebuie să fie echivalentă cu cantitatea de anticorpi utilizată.

5.3.5. Se incubează lamele pe hârtie umedă, acoperite timp de treizeci de minute la temperatura ambiantă (18-25 °C).

5.3.6. Se scutură picăturile de conjugat de pe lamă. Se clătesc și se spală în conformitate cu cele indicate anterior (5.3.3).

Se îndepărtează cu grijă excesul de umezeală.

5.3.7. Se pipetează 5-10 µl glicerol tamponat fosfatic 0,1 M (apendicele 4) sau un suport antidecolorare comercial în fiecare fereastră și se acoperă cu o lamă.

5.4. Citirea testului de imunofluorescență

5.4.1. Se examinează lamele de test la un microscop cu sursă de lumină epifluorescentă și cu filtre adaptate pentru a lucra cu izotiocianat de fluoresceină, sub imersiune în ulei sau în apă, la un grosisment de 500-1 000. Se examinează ferestrele de pe două diametre în unghi drept și de-a lungul perimetrului. Pentru eșantioanele fără celule sau cu un număr redus de celule se examinează cel puțin 40 câmpuri microscopice.

Se verifică mai întâi lama de control pozitiv. Celulele trebuie să fie intens fluorescente și colorate complet la titrul de anticorpi sau la diluția de lucru determinată. Testul IF (secțiunea VI.A.5) trebuie repetat în cazul în care apare o colorație anormală.

5.4.2. Se caută prezența celulelor intens fluorescente cu morfologia caracteristică a *R. solanacearum* în ferestrele de test ale lamelor (a se vedea website-ul http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Intensitatea fluorescenței trebuie să fie echivalentă cu cea a sușei de control pozitiv la aceeași diluție de anticorpi. Celulele cu colorație incompletă sau cu fluorescență slabă nu trebuie luate în considerare.

În cazul în care se suspectează o contaminare, testul trebuie refăcut. Se poate întâmpla atunci când toate lamele unui lot indică celule pozitive din cauza unei contaminări a tamponului sau atunci când celulele pozitive sunt izolate (în afara ferestrelor) la mijlocul lamei.

5.4.3. Există un anumit număr de chestiuni inerente specificității testului de imunofluorescență. Pot apărea populații de celule fluorescente atipice din punct de vedere morfologic și bacterii saprofite care provoacă reacții încrucișate cu o mărime și morfologie asemănătoare cu *R. solanacearum* în extractele concentrate de taloane de cartof și în bucățile de tulpini.

5.4.4. Trebuie luate în considerare numai celulele fluorescente ale căror dimensiune și morfologie sunt caracteristice titrului sau diluției de lucru a anticorpilor menționați la punctul 5.3.

5.4.5. Interpretarea testului IF:

(i) În cazul în care sunt descoperite celule intens fluorescente cu morfologie caracteristică, se determină numărul mediu de celule tipice pe câmp microscopic și se calculează numărul de celule tipice pe ml de extract concentrat resuspendat (apendicele 5).

Lectura testului de imunofluorescență se consideră ca fiind pozitivă pentru eșantioanele care conțin cel puțin 5×10^3 de celule tipice pe ml de extract concentrat resuspendat. Eșantionul se consideră ca fiind potențial infectat și se efectuează un nou test.

(ii) Lectura testului de imunofluorescență se consideră ca fiind negativă pentru eșantioanele care conțin mai puțin de 5×10^3 de celule pe ml de extract concentrat resuspendat și eșantionul se consideră ca fiind negativ. Efectuarea altor teste nu este obligatorie.

6. **Testele PCR**

Principii

În cazul în care testul PCR se folosește drept test principal de selecție, iar rezultatul acestuia este pozitiv, trebuie efectuat un test de izolare sau un test de imunofluorescență drept al doilea test de selecție obligatoriu. În cazul în care testul PCR se folosește ca test secundar, iar rezultatul este pozitiv, diagnosticul trebuie completat cu teste suplimentare, după cum indică diagrama funcțională.

O exploatare completă a acestei metode ca test principal de selecție se recomandă numai atunci când se dobândește o expertiză specializată în domeniu.

Notă: Testele preliminarii realizate în conformitate cu această metodă trebuie să permită o detectare reproductibilă de 10^3-10^4 de celule pe ml de *R. solanacearum* adăugate la extractele de eșantioane care au dat anterior rezultate negative. Poate fi necesară efectuarea unor experimente de optimizare în toate laboratoarele pentru a obține niveluri maxime de sensibilitate și de specificitate.

Se folosesc reactive și protocoale PCR validate (a se vedea apendicele 6). Se alege, de preferință, o metodă cu control intern.

Se iau măsurile de precauție necesare pentru a evita contaminarea eșantionului cu ADN țintă. Testul PCR ar trebui realizat de tehnicieni experimentați în laboratoare de biologie moleculară specializate, pentru a reduce cât mai mult posibilitatea contaminării cu ADN țintă.

Controalele negative (pentru procedurile de extracție de ADN și PCR) ar trebui tratate întotdeauna ca eșantioane finale în procedură, pentru a indica o eventuală apariție a unui transfer de ADN.

Următoarele controale negative ar trebui incluse în testul PCR:

— Extractul eșantionului care a produs anterior rezultate negative pentru depistarea *R. solanacearum*;

— Tampoanele de control utilizate pentru a extrage bacteria și ADN din eșantion;

— Amestecul reactiv pentru PCR.

Următoarele controale pozitive ar trebui incluse:

— Alicote ale extractelor concentrate resuspendate la care s-a adăugat *R. solanacearum* (preparare: a se vedea apendicele 3 B).

— Suspensie de 10^6 de celule pe ml dintr-un izolat virulent de *R. solanacearum* în apă (exemplu, NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; a se vedea apendicele 3 B).

— Atunci când este posibil, se folosește, de asemenea, în testul PCR, ADN extras din eșantioane de control pozitive.

Pentru a se evita o eventuală contaminare, controalele pozitive se prepară într-un mediu diferit de cel al eșantioanelor de testat.

Extractele de eșantioane trebuie curățate, atât cât este posibil, de particulele de sol. În anumite cazuri, atunci când se prevede utilizarea protocoalelor PCR, ar putea fi recomandabil să se prepare extracte din cartofi spălați.

Materialele de control pozitiv și negativ standardizate disponibile pentru utilizare în acest test sunt prevăzute în apendicele 3.

6.1. Metode de purificare a ADN

Se folosesc eșantioane de control pozitive și negative în conformitate cu metoda descrisă anterior (a se vedea apendicele 3).

Materialul de control se testează în același mod ca și eșantioanele.

Există o serie de metode de purificare a ADN țintă din substraturile de eșantioane complexe, ceea ce contribuie la eliminarea inhibitorilor PCR și a altor reacții enzimatice și concentrează ADN țintă în extractul de eșantion. Următoarea metodă a fost optimizată pentru utilizare în cadrul metodelor PCR validate indicate în apendicele 6.

(a) Metoda Pastrik (2000)

1. Se pipetează 220 µl de tampon de liză [100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)] într-un tub Eppendorf de 1,5 ml.

2. Se adaugă 100 µl de extract de eșantion și se introduce într-un bloc de încălzire sau în baie de abur la 95 °C timp de zece minute.

3. Se așază tubul pe gheață timp de cinci minute.

4. Se adaugă 80 µl de soluție concentrată de lizozimă (50 mg de lizozimă pe ml în 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) și se incubează la 37 °C timp de 30 de minute.

5. Se adaugă 220 µl de soluție A de Easy DNA® (Invitrogen), se amestecă bine în agitator și se incubează la 65 °C timp de 30 de minute.

6. Se adaugă 100 µl de soluție B de Easy DNA® (Invitrogen), se omogenizează bine în agitator până când precipitatul circulă liber în tub, iar eșantionul are o consistență vâscoasă uniformă.

7. Se adaugă 500 µl de cloroform și se omogenizează în agitator până când vâscozitatea este redusă și amestecul este omogen.

8. Se centrifughează la 15 000 g timp de 20 de minute la 4 °C pentru a separa fazele și a forma interfaza.

9. Faza superioară se transferă într-un nou tub Eppendorf.

10. Se adaugă 1 ml de etanol la 100 % (– 20 °C), se omogenizează scurt în agitator și se incubează pe gheață timp de zece minute.

11. Se centrifughează la 15 000 g timp de 20 de minute la 4 °C și se îndepărtează etanolul din extractul concentrat.

12. Se adaugă 500 µl de etanol la 80 % (– 20 °C) și se amestecă rotind tubul.

13. Se centrifughează la 15 000 g timp de zece minute la 4 °C, se păstrează extractul concentrat și se îndepărtează etanolul.

14. Extractul concentrat se lasă să se usuce în aer liber sau într-un SpeedVac ADN.

15. Se face o nouă suspensie de extract concentrat în 100 µl de apă ultrapură sterilă și se lasă la temperatura ambiantă timp de cel puțin douăzeci de minute.

16. Se depozitează la – 20 °C până când extractul este necesar pentru PCR.

17. Se izolează orice precipitat alb prin centrifugare și se utilizează pentru PCR 5 µl de supranatant conținând ADN.

(b) Alte metode

Alte metode de extragere a ADN, de exemplu, Qiagen DNeasy Plant Kit, s-ar putea aplica cu condiția ca acestea să aibă o eficacitate echivalentă pentru a purifica ADN din eșantioanele de control cu un conținut de 10^3-10^4 de celule patogene pe ml.

6.2. PCR

6.2.1. Se prepară, pentru PCR, matricele de testare și de control în conformitate cu protocoalele validate (secțiunea VI.A.6). Se prepară o diluție decimală din extractul de eșantion de ADN (1:10 în apă ultrapură).

6.2.2. Se prepară amestecul reactiv corespunzător pentru PCR într-un mediu neinfectat în conformitate cu protocoalele publicate (apendicele 6). În cazul în care este posibil, se recomandă utilizarea unui protocol PCR compus care include, de asemenea, un control intern al PCR.

6.2.3. Se adaugă 2-5 µl de extract de ADN pe 25 µl de mediu reactiv PCR în tuburi PCR sterile în conformitate cu protocoalele PCR (a se vedea apendicele 6).

6.2.4. Se include un eșantion de control negativ conținând numai un amestec reactiv pentru PCR și se adaugă la aceeași sursă de apă ultrapură ca și cea utilizată în amestecul pentru PCR în locul eșantionului.

6.2.5. Tuburile se introduc în același ciclor termic ca și cel utilizat la testul preliminar și se lansează programul PCR optimizat în mod corespunzător (apendicele 6).

6.3. Analiza produsului reacției PCR

6.3.1. Fragmentele PCR se detectează prin electroforeză în gel de agar. Se pune sub tensiune la 5-8 V/cm o cantitate de cel puțin 12 µl de amestec reactiv de ADN amplificat din fiecare eșantion împreună cu 3 µl de tampon de lest (apendicele 6) pe un mediu agarizat la 2,0 % într-un tampon tri-acetat-EDTA (ETA) (apendicele 6). Se folosește un marcator de ADN corespunzător, precum «100 bp ladder».

6.3.2. Pentru vizualizarea fragmentelor de ADN, se recurge la colorare cu bromură de etidiu (la 0,5 mg/l) timp de 30-60 de minute, luând măsurile de precauție necesare pentru manipularea acestui agent mutagen.

6.3.3. În cazul unor produse PCR amplificate având mărimea așteptată (apendicele 6), gelul colorat se vizualizează prin iluminare ultravioletă cu unde scurte (λ = 302 nm) și se notează rezultatele.

6.3.4. Pentru noile cazuri sau constatări, se verifică autenticitatea fragmentului amplificat PCR efectuând o analiză enzimatică restrictivă pe un eșantion al ADN amplificat rămas. În acest scop, se incubează la o temperatură optimă pe o durată optimă folosind o enzimă și un tampon corespunzător (a se vedea apendicele 6). Fragmentele digerate prin electroforeză în gel de agar se detectează în conformitate cu metoda descrisă anterior și se vizualizează prin iluminare ultravioletă dispunerea tipică a fragmentelor după analiza enzimatică restrictivă și colorarea cu bromură de etidiu. Apoi se compară cu șușele de control pozitiv înainte și după macerare.

Interpretarea rezultatului testului PCR

Testul PCR este negativ atunci când în eșantionul respectiv nu este detectat fragmentul PCR caracteristic de *R. solanacearum* având dimensiunea prevăzută, iar fragmentul este detectat pentru toate eșantioanele de control pozitiv (în cazul unui test PCR compus, cu primeri de control intern specifici plantei: un al doilea produs PCR de dimensiunea prevăzută trebuie amplificat cu eșantionul respectiv).

Testul PCR este pozitiv în cazul în care este detectat fragmentul PCR caracteristic de *R. solanacearum* de dimensiunea și tipul de restricție prevăzut (atunci când este nevoie), cu condiția să nu fie amplificat cu unul dintre eșantioanele de control negativ. Se poate obține o confirmare fiabilă a rezultatului pozitiv prin repetarea testului cu un al doilea set de primeri PCR (apendicele 6).

Notă: Se poate suspecta o inhibiție a PCR în cazul în care fragmentul amplificat prevăzut este obținut din eșantionul de control pozitiv conținând *R. solanacearum* în apă, dar se obțin rezultate negative din eșantioane de control pozitiv conținând *R. solanacearum* în extractul de cartof. În protocoalele PCR compuse, cu control intern al PCR, se constată inhibiția reacției atunci când nu se obține nici unul dintre cele două fragmente amplificate.

Se poate suspecta o contaminare atunci când fragmentul amplificat prevăzut este obținut din unul sau mai multe controale negative.

7. **Testul FISH**

Principiu

În cazul în care testul FISH se folosește în calitate de test principal de selecție și rezultatul lui este pozitiv, trebuie efectuat un test de izolare sau un test IF drept al doilea test obligatoriu de selecție. În cazul în care testul IF se folosește ca test secundar și rezultatul lui este pozitiv, analiza trebuie completată cu teste suplimentare, după cum indică diagrama funcțională.

Notă: Se folosesc oligosonde validate specifice de *R. solanacearum* (a se vedea apendicele 7). Testele preliminare efectuate în conformitate cu această metodă trebuie să permită o detectare reproductibilă de 10^3-10^4 de celule pe ml de *R. solanacearum* adăugate la extractele de eșantioane care au dat anterior rezultate negative.

Este de preferat să se aplice procedura descrisă în continuare extractelor de eșantioane proaspăt preparate, dar se pot folosi și extracte de eșantion conservate în soluție de glicerol la temperaturi cuprinse între – 16 °C și – 24 °C sau între – 68 °C și – 86 °C.

Drept eșantioane de control negativ, se folosesc alicote de extracte de eșantion care au dat anterior rezultate negative la testele de identificare a *R. solanacearum*.

Drept eșantioane de control pozitiv, se prepară suspensii conținând 10^5-10^6 de celule pe ml de biovar 2 *R. solanacearum* (de exemplu, sușa NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; a se vedea apendicele 3) într-un tampon fosfat 0,01 M (PB), dintr-o cultură de 3-5 zile. Se prepară lame separate de control pozitiv din sușa omologă sau din orice altă sușă de referință de *R. solanacearum*, în suspensie în extract de cartof, în conformitate cu apendicele 3 B.

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

Materialele de control pozitiv și negativ standardizate disponibile pentru acest test sunt prevăzute în apendicele 3 litera A.

Materialul de control se testează în același mod ca și eșantioanele.

7.1. Fixarea extractului de cartof

Protocolul descris în continuare se bazează pe Wullings *et al.* (1998):

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

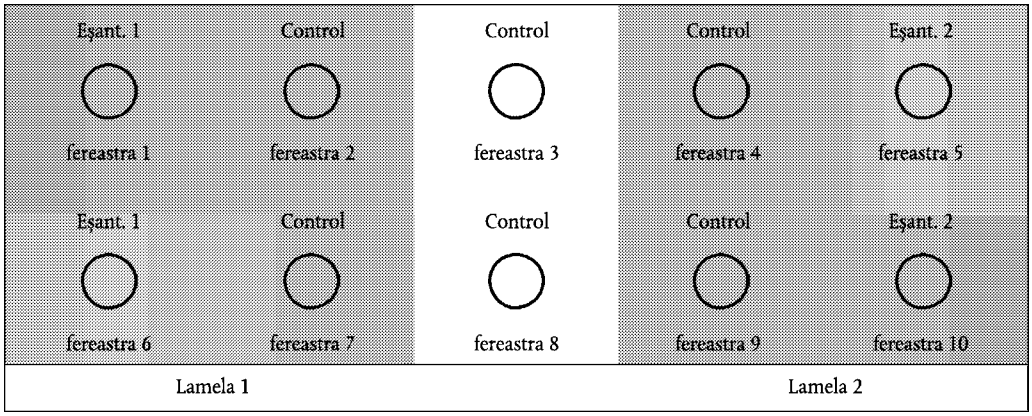
7.1.2. Se pipetează 100 µl din fiecare extract de eșantion într-un tub Eppendorf și se centrifughează timp de șapte minute la 7 000 g.

7.1.3. Se îndepărtează supranatantul și se dizolvă extractul concentrat în 200 µl de fixativ preparat cu mai puțin de 24 ore înainte. Se omogenizează în agitator și se incubează timp de o oră în frigider.

7.1.4. Se centrifughează timp de șapte minute la 7 000 g, se îndepărtează supranatantul și se face o nouă suspensie de extract concentrat în 75 µl de PB 0,01 M (a se vedea apendicele 7).

7.1.5. Se picură 16 µl din suspensiile fixate pe o lamă multitest curată, în conformitate cu figura 7.1. Pe fiecare lamă se aplică două eșantioane diferite, nediluate, și se folosesc 10 µl pentru o diluție de 1:100 (într-un tampon fosfat 0,01 M). Restul soluției de eșantion (49 µl) poate fi conservată la – 20 °C după ce i s-a adăugat un volum de etanol de 96 %. În cazul în care testul FISH trebuie repetat, se elimină etanolul prin centrifugare și se adaugă un volum echivalent de tampon fosfat 0,01 M (se amestecă în agitator).

Figura 7.1. Configurația unei lame pentru testul FISH



7.1.6. Se usucă lamele la aer (sau într-un uscător, la 37 °C), apoi se fixează prin trecere prin flamă.

Procedura poate fi întreruptă în acest stadiu și întreprinsă hibridizarea a doua zi. Lamele trebuie păstrate la adăpost de praf, într-un loc uscat și la temperatura ambiantă.

7.2. Hibridizare

7.2.1. Se deshidratează celulele prin băi succesive de etanol de 50 %, 80 % și 96 % cu o durată de un minut fiecare. Se aranjează lamele pe un suport și se lasă la uscat în aer liber.

7.2.2. Se pregătește o cameră de incubare umedă căptușind fundul unei cutii ermetice cu hârtie absorbantă sau cu hârtie de filtru impregnată cu hibmix 1X (a se vedea apendicele 7). Cutia se preincubează timp de cel puțin zece minute în cuptorul de hibridizare la o temperatură de 45 °C.

7.2.3. Se picură 10 µl de soluție de hibridizare (apendicele 7) în opt ferestre (ferestrele 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 și 10; a se vedea figura 7.1) ale fiecărei lame lăsând goale cele două ferestre din mijloc (3 și 8).

7.2.4. Se acoperă cu lamele (24 × 24 mm) prima și ultimele patru ferestre având grijă să nu rămână aer sub ele. Lamele se introduc în camera umedă încălzită în prealabil și se lasă timp de cinci ore în cuptor la 45 °C în întuneric, pentru a permite hibridizarea.

7.2.5. Se pregătesc trei pahare de laborator conținând 1 l de apă Milli Q (biologie moleculară), 1 l de hibmix 1X [334 ml de hibmix 3X și 666 ml de apă Milli Q (biologie moleculară)] și 1 l de hibmix 1/8X [42 ml de hibmix 3X și 958 ml de apă Milli Q (biologie moleculară)]. Se preincubează fiecare pahar de laborator în baie de abur la 45 °C.

7.2.6. Se îndepărtează lamelele de pe lame și se pun pe un suport de lame.

7.2.7. Se elimină excedentul de eșantion prin incubare timp de cincisprezece minute la 45 °C în paharul cu hibmix 1X.

7.2.8. Se pune suportul de lame într-o soluție de spălare cu hibmix 1/8X și se lasă la incubat timp de încă 15 minute.

7.2.9. Lamele se introduc scurt într-o baie de apă Milli Q și se pun pe o hârtie de filtru. Se îndepărtează umiditatea excedentară tamponând ușor suprafața umedă cu hârtie de filtru. Se pipetează în fiecare fereastră 5-10 µl de soluție antidecolorare (de exemplu, Vectashield produs de Vecta Laboratories CA, USA sau altă soluție echivalentă) și se acoperă întreaga suprafață a lamei cu o lamelă (24 × 60 mm).

7.3. Lectura testului FISH

7.3.1. Se examinează de îndată lamele la un microscop cu epifluorescență, sub imersiune în ulei la un grosisment de 630 × 1 000. Cu un filtru sensibil la izotiocianat de fluoresceină (FITC), celulele eubacteriene (inclusiv majoritatea celulelor gram-negative) prezente în eșantion se văd colorate în verde fluorescent. Cu un filtru adaptat la tetrametil-rodamin-5-izotiocianat, celulele de *R. solanacearum* marcate cu Cy3 apar colorate în roșu fluorescent. Se compară morfologia celulelor cu cea a eșantioanelor de control pozitiv. Celulele trebuie să fie colorate complet și intens fluorescente. Testul FISH (secțiunea VI.A.7) trebuie repetat în cazul în care apare o colorație anormală. Ferestrele se examinează de-a lungul a două diametre perpendiculare și în jurul perimetrului. Pentru eșantioanele care nu conțin celule sau conțin un număr mic al acestora, se examinează cel puțin 40 de câmpuri microscopice.

7.3.2. Se observă prezența celulelor intens fluorescente, cu o morfologie tipică de *R. solanacearum* în ferestrele de test ale lamelor (a se vedea website-ul http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Intensitatea fluorescenței trebuie să fie echivalentă cu cea a sușei de control pozitiv sau mai bună. Celulele cu colorație incompletă sau cu fluorescență slabă nu trebuie luate în considerare.

7.3.3. La cea mai mică suspiciune de contaminare, testul trebuie refăcut. Aceasta se poate întâmpla atunci când toate lamele unui lot indică prezența de celule pozitive din cauza contaminării tamponului sau atunci când celulele pozitive sunt izolate (în afara ferestrelor) pe mijlocul lamei.

7.3.4. Există un anumit număr de chestiuni inerente specificității testului FISH. Pot apărea populații de celule fluorescente cu morfologie atipică și de bacterii saprofite care provoacă reacții încrucișate cu dimensiuni și morfologii asemănătoare cu *R. solanacearum* în extractele concentrate de taloane de cartofi și bucăți de tulpini, deși în proporție mult mai mică decât în cazul testului IF.

7.3.5. Se iau în considerare numai celulele fluorescente ale căror dimensiune și morfologie sunt tipice.

7.3.6. Interpretarea rezultatului testului FISH:

(i) Se obțin rezultate valabile ale testului FISH atunci când celulele intens fluorescente de culoare verde, cu dimensiuni și morfologie tipice pentru *R. solanacearum* sunt vizibile cu ajutorul filtrului FITC și celulele intens fluorescente de culoare roșie sunt vizibile folosind filtrul cu rodamin în toate eșantioanele de control pozitiv și în nici un eșantion de control negativ. În cazul în care eșantionul conține celule intens fluorescente și având o morfologie tipică, se estimează numărul mediu de celule tipice pe câmp microscopic și se calculează numărul de celule tipice pe ml de extract concentrat resuspendat (apendicele 4). Eșantioanele conținând cel puțin 5×10^3 de celule tipice pe ml de extract concentrat resuspendat se consideră ca fiind potențial infectate. Se recomandă continuarea testărilor. Eșantioanele conținând mai puțin de 5×10^3 de celule tipice pe ml de extract concentrat resuspendat sunt considerate ca fiind negative.

(ii) Testul FISH este negativ în cazul în care celulele intens fluorescente de culoare roșie, având dimensiuni și morfologie caracteristice pentru *R. solanacearum*, nu se văd cu ajutorul filtrului cu rodamin, cu condiția ca celulele intens fluorescente de culoare roșie să fie vizibile la pregătirea eșantioanelor de control pozitiv folosind filtrul cu rodamin.

8. **Testele ELISA**

Principiu

ELISA nu poate fi utilizat ca test facultativ pe lângă testele IF, PCR sau FISH din cauza sensibilității sale relativ slabe. În cazul aplicării metodei DAS-ELISA, îmbogățirea și utilizarea anticorpilor monoclonali este obligatorie (a se vedea website-ul http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Îmbogățirea eșantioanelor până la efectuarea testului ELISA poate fi utilă pentru sporirea sensibilității acestuia, dar poate să eșueze din cauza concurenței altor organisme în eșantion.

Notă: Se folosește o sursă validată de anticorpi de *R. solanacearum* (a se vedea website-ul http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Se recomandă să se stabilească titrul pentru fiecare lot nou de anticorpi. Titrul se definește ca fiind cea mai mare diluție la care se obține o reacție optimă atunci când se testează o suspensie de 10^5-10^6 celule pe ml din sușa omologă de *R. solanacearum* folosind conjugate corespunzătoare de anticorpi secundari, în conformitate cu recomandările producătorului. La efectuarea testului, diluția de lucru a anticorpilor trebuie să fie aproximativ egală sau egală cu cea a titrului formulei comerciale.

Se stabilește titrul anticorpilor într-o suspensie de 10^5-10^6 celule/ml din sușa omologă de *R. solanacearum*.

Se include un extract de eșantion care a dat anterior rezultate negative pentru *R. solanacearum* și o suspensie a unei bacterii care nu provoacă reacții încrucișate într-un tampon fosfat (PBS) ca eșantioane de control negativ.

Drept eșantion de control pozitiv, se folosesc alicote de extracte de eșantion care au dat anterior rezultate negative, amestecate cu 10^3-10^4 de celule/ml de biovar 2 de *R. solanacearum* (de exemplu, sușa NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; a se vedea apendicele 2 A și B). Pentru a compara rezultatele din fiecare placă, se folosește o suspensie standard de 10^5-10^6 de celule/ml în PBS de *R. solanacearum*. Eșantioanele de control pozitiv trebuie separate cu grijă, pe placa de microtitrare, de eșantionul sau eșantioanele care fac obiectul testului.

Materialele de control pozitiv și negativ standardizate, disponibile pentru utilizare cu acest test sunt enumerate în apendicele 3 litera A.

Materialul de control se testează în același mod ca și eșantioanele.

Au fost validate două protocoale ELISA:

(a) ELISA indirect (Robinson-Smith *et al.*, 1995)

(1) Se folosesc alicote de 100-200 µl de extract concentrat. (Se încălzește timp de patru minute la 100 °C în baie de abur sau într-un bloc de încălzire pentru a reduce rezultatele nespecifice în anumite cazuri).

(2) Se adaugă un volum egal de tampon dublu concentrat (apendicele 4) și se omogenizează în agitator.

(3) Se aplică 100 µl alicote în fiecare dintre minimum două godeuri ale plăcii de microtitrare (de exemplu, Nunc-Polysorp sau echivalent) și se incubează o oră la 37 °C sau peste noapte la 4 °C.

(4) Se scot extractele din godeuri. Se spală godeurile de trei ori cu PBS-Tween (apendicele 4), lăsând ultima soluție de spălare cel puțin cinci minute în godeuri.

(5) Se prepară diluția corespunzătoare a antiserului anti-*R. solanacearum* în tampon de saturație (apendicele 4). Pentru anticorpii comerciali validați, se folosesc diluțiile recomandate (de obicei, de două ori mai concentrate decât titrul).

(6) Se aplică 100 µl în fiecare godeu și se incubează o oră la 37 °C.

(7) Se scoate soluția de anticorpi din godeuri și se spală în conformitate cu cele indicate anterior (punctul 4).

(8) Se prepară diluția corespunzătoare de conjugați secundari de anticorpi și de fosfatază alcalină în tampon de saturație. Se adaugă 100 µl în fiecare godeu și se incubează o oră la 37 °C.

(9) Se scoate conjugatul de anticorpi din godeuri și se spală în conformitate cu cele indicate anterior (punctul 4).

(10) Se adaugă 100 µl de soluție de substrat de fosfatază alcalină (apendicele 4) în fiecare godeu. Se incubează în întuneric la temperatura ambiantă și se măsoară absorbanța la 405 nm la intervale regulate în termen de 90 de minute.

(b) DAS-ELISA

(1) Se prepară diluția corespunzătoare de imunoglobuline policlonale anti-*R. solanacearum* în tampon concentrat cu pH 9,6 (apendicele 4). Se adaugă 200 µl în fiecare godeu. Se incubează timp de patru-cinci ore la 37 °C sau timp de 16 ore la 4 °C.

(2) Se spală godeurile de trei ori cu PBS-Tween (apendicele 4).

Se adaugă 190 µl de extract de eșantion în cel puțin două godeuri. De asemenea, se adaugă eșantioane de control pozitiv și negativ în două godeuri pe fiecare placă. Se incubează timp de șaisprezece ore la 4 °C.

(3) Se spală godeurile de trei ori cu PBS-Tween (apendicele 4).

(4) Se prepară o diluție corespunzătoare de anticorpi monoclonali specifici *R. solanacearum* în PBS (apendicele 4) conținând, de asemenea, 0,5 % seralbumină bovină (BSA) și se adaugă 190 µl în fiecare godeu. Se incubează două ore la 37 °C.

(5) Se spală godeurile de trei ori cu PBS-Tween (apendicele 4).

(6) Se prepară o diluție corespunzătoare de imunoglobuline antișoarece conjugate cu fosfatază alcalină în PBS. Se adaugă 190 µl în fiecare godeu. Se incubează două ore la 37 °C.

(7) Se spală godeurile de trei ori cu PBS-Tween (apendicele 4).

(8) Se prepară o soluție de substrat al fosfatazei alcaline conținând 1 mg de p-nitrofenil fosfat pe ml de substanță tamponată (apendicele 4). Se adaugă 200 µl în fiecare godeu. Se incubează în întuneric la temperatura ambiantă și se măsoară absorbanța la 40 nm la intervale regulate în termen de 90 de minute.

Interpretarea rezultatelor testelor ELISA

Testul ELISA este negativ atunci când densitatea optică (DO) medie a godeurilor eșantionului dublu este mai mică decât densitatea optică dublă a godeurilor controlului negativ, cu condiția ca densitatea optică a controlului pozitiv să fie întotdeauna mai mare decât 1,0 (după 90 de minute de incubare cu substratul) și mai mare decât DO dublă obținută pentru extractele de eșantioane de control negativ.

Testul ELISA este pozitiv atunci când densitatea optică (DO) medie a godeurilor eșantionului dublu este mai mare decât densitatea optică dublă a godeurilor controlului negativ, cu condiția ca DO pentru toate godeurile eșantioanelor de control negativ să fie mai mică decât de două ori DO obținută pentru godeurile eșantioanelor de control pozitiv.

O lectură negativă ELISA în godeurile eșantioanelor de control pozitiv indică faptul că testul nu a fost efectuat corect sau că a fost inhibat. O lectură ELISA pozitivă în godeurile eșantioanelor de control negativ indică o contaminare încrucișată sau o legătură de anticorpi nespecifică.

9. **Testul biologic**

Notă: Testele preliminare efectuate în conformitate cu această metodă trebuie să permită o detectare reproductibilă a 10^3-10^4 celule formând colonii de *R. solanacearum* per ml adăugate la extractele de eșantioane care au dat anterior rezultate negative (preparare: a se vedea apendicele 3).

Poate fi atins gradul de sensibilitate cel mai mare atunci când se folosesc extracte de eșantioane proaspăt preparate și în condiții optime de creștere. Cu toate acestea, metoda se poate aplica cu succes extractelor păstrate sub glicerol la o temperatură cuprinsă între – 68 și – 86 °C.

Următorul protocol se bazează pe protocolul Janse (1988):

9.1. Se utilizează zece plante de test ale unui cultivar de tomată sensibil (de exemplu, Moneymaker sau un cultivar cu o sensibilitate echivalentă stabilită în laboratorul de testare) în stadiul celei de-a treia frunze adevărate pentru fiecare eșantion. Pentru detalii privind cultura, a se vedea apendicele 8. De asemenea, se pot utiliza vinete (de exemplu, Black Beauty sau cultivari cu o sensibilitate echivalentă), alegând numai plante în stadiul celei de-a doua sau a treia frunze până la dezvoltarea completă a celei de-a treia frunze adevărate. Cu toate acestea, s-a constatat că simptomele sunt mai puțin grave și se dezvoltă mai încet la plantele de vânătă. Prin urmare, atunci când este posibil, se recomandă utilizarea plantulelor de tomată.

9.2. Se distribuie 100 µl de extract între plantele de test.

9.2.1. Inoculare prin injectare

Cu ajutorul unei seringi cu ac hipodermic (minimum 23G) se inoculează în tulpina plantei chiar deasupra cotiledoanelor. Se repartizează eșantionul între plantele test.

9.2.2. Inoculare prin incizie

Se ține planta între două degete și se pipetează pe tulpină, între cotiledoane și prima frunză, o picătură (circa 5-10 µl) de extract concentrat suspendat.

Cu ajutorul unui scalpel steril, plecând de la picătura de extract concentrat, se face o incizie diagonală cu o lungime de 1,0 cm și o adâncime egală aproximativ cu două treimi din grosimea tulpinii.

Se închide incizia aplicând vaselină sterilă cu ajutorul unei seringi.

9.3. Prin aceeași tehnică, se inoculează cinci plantule cu o suspensie apoasă de 10^5-10^6 celule pe ml dintr-o sușă virulentă de patruzeci și opt de ore din biovar 2 de *R. solanacearum* drept control pozitiv și cu tampon de concentrare (apendicele 4) drept control negativ. Se separă plantele de control pozitiv și negativ de celelalte plante pentru a evita contaminările încrucișate.

9.4. Plantele test se cresc în încăperi de carantină până la patru săptămâni la 25-30 °C și umiditate relativă mare, stropindu-le în mod corespunzător pentru a preveni o suprasaturare hidrică sau ofilirea din lipsă de apă. Pentru a evita contaminarea, plantele de control pozitiv și negativ se incubează separat în standuri separate în mod corespunzător într-o seră sau cameră de cultivare sau, în cazul în care spațiul este limitat, se asigură o separare strictă între metodele de tratare. Atunci când plantele aparținând unor eșantioane diferite trebuie incubate în apropiere unele de celelalte, trebuie prevăzute între ele ecrane de separare corespunzătoare. În timpul fertilizării, stropirii, controlului sau oricărei alte manipulări, trebuie luate toate măsurile de precauție pentru a evita o contaminare încrucișată. Este esențial ca în serele și camerele de cultivare să nu fie insecte, dat fiind faptul că acestea ar putea transmite bacteria de la un eșantion la altul.

Se observă apariția simptomelor de ofilire: epinastie, clorază și/sau pipernicire.

9.5. Se izolează de plantele infectate (secțiunea II.3) și se identifică culturile purificate de *R. solanacearum* prezumtiv (secțiunea VI.B).

9.6. În cazul în care nu se observă nici un simptom după trei săptămâni, se efectuează un test IF/PCR/de izolare pe un eșantion compozit de bucăți de tulpină de 1 cm prelevate de la fiecare plantă test chiar deasupra punctului de inoculare. În cazul în care testul este pozitiv, se efectuează un test prin diluare și însămânțare (secțiunea 4.1).

9.7. Se identifică orice cultură purificată de *R. solanacearum* prezumtiv (secțiunea VI.B).

Interpretarea rezultatelor testului biologic

Se obțin rezultate valabile ale testului biologic atunci când plantele de control pozitiv prezintă simptome tipice, bacteriile pot fi izolate din nou pe aceste plante și nu se observă nici un simptom la plantele de control negativ.

Testul biologic este negativ în cazul în care plantele test nu sunt infectate cu *R. solanacearum* și cu condiția ca *R. solanacearum* să fie detectată în controalele pozitive.

Testul biologic este pozitiv atunci când plantele test sunt infectate cu *R. solanacearum*.

B. *TESTE DE IDENTIFICARE*

Culturile pure prezumtive de *R. solanacearum* se identifică prin cel puțin unul dintre următoarele teste bazate pe principii biologice diferite.

Se includ, după caz, sușe de referință cunoscute pentru fiecare test efectuat (a se vedea apendicele 3).

1. **Teste de identificare enzimatice și de nutriție**

Se stabilesc următoarele caracteristici fenotipice prezente sau absente sistematic la *R. solanacearum* în conformitate cu metodele Lelliott și Stead (1987), Klement *et al.* (1990) și Schaad (2001).

Test	Rezultat preconizat
Producția de pigmenți fluorescenți	–
Incluziuni de poli-ß-hidroxibutirat	+
Test de oxidare/fermentare (O/F)	O+/F–
Activitatea catalazei	+
Testul oxidazei de Kovac	+
Reducerea nitratului	+
Utilizarea citratului	+
Creștere la 40 °C	–
Creștere în 1 % NaCl	+
Creștere în 2 % NaCl	–
Activitatea dihidrolazei argininei	–
Lichefierea gelatinei	–
Hidroliza amidonului	–
Hidroliza esculinei	–
Producție de levan	–

2. **Testul IF**

2.1. Se prepară o suspensie de circa 10^6 celule/ml într-un tampon de imunofluorescență (apendicele 4).

2.2. Se prepară o serie de diluții duble dintr-un antiser corespunzător (a se vedea website-ul http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

2.3. Se aplică procedura testului IF (secțiunea VI.A.5).

2.4. Pentru ca un test IF să fie pozitiv, titrul obținut pentru cultura în imunofluorescență trebuie să fie echivalent cu cel al controlului pozitiv.

3. **Testul ELISA**

Notă: În cazul în care se efectuează numai două teste de identificare, nu se efectuează alte teste serologice pe lângă această metodă.

3.1. Se prepară o suspensie de circa 10^8 celule/ml în PBS 1X (apendicele 4).

3.2. Se aplică procedura ELISA corespunzătoare cu un anticorp monoclonal specific de *R. solanacearum*.

3.3. Un test ELISA este pozitiv atunci când valoarea ELISA a culturii este egală cel puțin cu jumătatea celei obținute pentru controlul pozitiv.

4. **Testul PCR**

4.1. Se prepară o suspensie de circa 10^6 celule/ml în apă sterilă pentru biologie moleculară.

4.2. Se încălzesc 100 µl din suspensie în tuburi închise într-un bloc de încălzire sau în baie de abur fierbinte la 100 °C timp de patru minute. Eșantioanele pot fi păstrate apoi la o temperatură situată între – 16 și – 24 °C până în momentul în care sunt necesare.

4.3. Se aplică procedurile PCR corespunzătoare pentru amplificarea fragmentelor tipice de *R. solanacearum* [a se vedea, de exemplu, Seal *et al.* (1993), Pastrik & Maiss (2000), Pastrik *et al.* (2002), Boudazin *et al.* (1999), Opina *et al.* (1997), Weller *et al.* (1999)].

4.4. O identificare pozitivă a *R. solanacearum* se obține atunci când fragmentele amplificate PCR au aceeași dimensiune și aceleași polimorfisme ale dimensiunii fragmentelor de restricție ca în cazul celor ale sușei de control pozitiv.

5. **Testul FISH**

5.1. Se prepară o suspensie de circa 10^6 celule/ml în apă ultrapură.

5.2. Se aplică procedura FISH (secțiunea VI.A.7) cu cel puțin două oligosonde specifice de *R. solanacearum* (apendicele 7).

5.3. Pentru ca un test FISH să fie pozitiv, cultura trebuie să prezinte aceleași reacții ca și controlul pozitiv.

6. **Profilul acizilor grași (FAP)**

6.1. Se crește cultura timp de 48 ore la 28 °C în mediu tripticaz-soia-agar (Oxoid).

6.2. Se aplică procedura FAP corespunzătoare (Janse, 1991; Stead, 1992).

6.3. Pentru ca un test FAP să fie pozitiv, profilul culturii prezumtive trebuie să fie identic cu cel al controlului pozitiv. Prezența acizilor grași caracteristici 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH și 18:1 2OH și absența 16:0 3OH indică prezența *Ralstonia* sp.

7. **Metode de caracterizare a sușei**

Se recomandă o caracterizare a sușei prin una dintre următoarele metode pentru fiecare caz nou de izolare a *R. solanacearum*.

Se includ, după caz, sușe de referință cunoscute pentru fiecare test efectuat (a se vedea apendicele 3).

7.1. Determinarea biovarului

Există diferiți biovari de *R. solanacearum* în funcție de capacitatea lor de a utiliza și/sau oxida trei zaharuri și trei hexoze alcoolice (Hayward, 1964 și Hayward *et al.*, 1990). Mediile de creștere pentru testul biovarului sunt descrise în apendicele 2. Testul poate fi realizat inoculând prin injectarea profundă a mediilor cu culturi pure de izolat de *R. solanacearum* și prin incubare la 28 °C. În cazul în care mediile sunt repartizate pe plăci de cultură cu 96 de godeuri sterile (200 µl/godeu), se poate observa o modificare a culorii, în 72 ore, din verde oliv în galben, ceea ce indică un rezultat pozitiv al testului.

	Biovar				
	1	2	3	4	5
Utilizarea:					
Maltozei	–	+	+	–	+
Lactozei	–	+	+	–	+
D (+) Celobiozei	–	+	+	–	+
Manitolului	–	–	+	+	+
Sorbitolului	–	–	+	+	–
Dulcitolului	–	–	+	+	–

Teste suplimentare diferențiază biovarul 2 în subfenotipuri

	Biovar 2A (răspândit în lume)	Biovar 2A (găsit în Chile și în Columbia)	Biovar 2T (găsit în zona tropicală)
Utilizarea trehalozei	–	+	+
Utilizarea mezo-inozitei	+	–	+
Utilizarea D-ribozei	–	–	+
Activitate pectolitică [1]	scăzută	scăzută	ridicată

[1] A se vedea Lelliott & Stead (1987)

7.2. Amprentă genomică

Diferențierea moleculară a sușelor din complexul *R. solanacearum* se poate face prin:

7.2.1. Analiza polimorfismului dimensiunii fragmentelor de restricție RFLP (Cook *et al.*, 1989).

7.2.2. PCR pe secvențe repetitive folosind primeri [REP, BOX și ERIC (Louws *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995)].

7.2.3. Analiza polimorfismului dimensiunii fragmentelor de restricție amplificate (Van der Wolf *et al.*, 1998).

7.3. Metodele PCR

Se pot folosi primeri specifici PCR (Pastrik et al., 2002; a se vedea apendicele 6) pentru a diferenția sușele aparținând diviziunii 1 (biovari 3, 4 și 5) și diviziunii 2 (biovari 1, 2A și 2T) ale *R. solanacearum*, astfel cum au fost definite inițial de analiza RFLP (Cook *et al.*, 1989) și secvența 16S a ADNr (Taghavi *et al.*, 1996).

C. *TEST DE CONFIRMARE*

Testul de patogenitate trebuie efectuat pentru confirmarea finală a diagnosticului de *R. solanacearum* și pentru evaluarea virulenței culturilor identificate ca fiind *R. solanacearum*.

(1) Se prepară un inoculum de circa 10^6 celule/ml dintr-o cultură de 24-48 ore de izolat și dintr-o sușă corespunzătoare de control pozitiv de *R. solanacearum* (de exemplu, NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; a se vedea apendicele 3).

(2) Se inoculează 5-10 plantule de tomată sau vânătă sensibile, la nivelul celei de a treia frunze adevărate (a se vedea secțiunea VI.A.9).

(3) Se incubează până la două săptămâni la 25-28 °C și într-o umiditate relativă crescută, asigurând o stropire corespunzătoare pentru a preveni suprasaturarea hidrică sau stresul de deshidratare. În cazul culturilor pure, în 15 zile ar trebui să intervină ofilirea. În absența simptomelor la sfârșitul acestei perioade, cultura nu poate fi confirmată ca fiind o formă patogenă a *R. solanacearum*.

(4) Se observă apariția simptomelor de ofilire și/sau epinastie, cloroză și de pipernicire.

(5) Se izolează plantele simptomatice îndepărtând o secțiune de țesut din tulpină la 2 cm deasupra punctului inoculării. Se mărunțește și se suspendă într-un volum mic de apă distilată sterilă sau cu un tampon fosfat de 50 mM (apendicele 4). Se izolează suspensia prin diluare într-un mediu adecvat, de preferință mediu selectiv (apendicele 2), se incubează timp de 48-72 ore la 28 °C și se observă formarea coloniilor tipice de *R. solanacearum*.

Apendicele 1

Laboratoarele care efectuează optimizarea și validarea protocoalelor

Laborator (1)	Loc	Țara
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Viena și Linz	Austria
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Belgia
Plantedirektoratet	Lyngby	Danemarca
Central Science Laboratory	York	Anglia
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburgh	Scoția
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	Franța
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Franța
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Germania
Pflanzenschutzamt Hannover	Hanovra	Germania
State Laboratory	Dublin	Irlanda
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali	Bologna	Italia
Regione Veneto Unità Periferica per i Servizi Fitosanitari	Verona	Italia
Nederlandse Algemene Keuringsdienst	Emmeloord	Țările de Jos
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Țările de Jos
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lisabona	Portugalia
Centro Diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	Spania
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias	Valencia	Spania
Swedish University of Agricultural Sciences	Uppsala	Suedia

(1) Experți de contact: a se vedea http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main.

Apendicele 2

Medii pentru izolarea şi cultura *R. solanacearum*

(a) **Medii de creștere în general**

Geloză nutritivă (GN)

Geloză nutritivă (Difco)	23,0 g
Apă distilată	1,0 l

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

Geloză cu drojdie – peptonă – glucoză (YPGA)

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

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

Geloză cu zaharoză – peptonă (SPA)

Zaharoză	20,0 g
Bacto-peptonă (Difco)	5,0 g
K2HPO4	0,5 g
MgSO4·7H2O	0,25 g
Bacto-geloză (Difco)	15,0 g
Apă distilată	1,0 l

pH 7,2-7,4

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

Mediul de tetrazoliu Kelman

Acizi casaminici (Difco)	1,0 g
Bacto-peptonă (Difco)	10,0 g
Dextroză	5,0 g
Bacto-agar (Difco)	15,0 g
Apă distilată	1,0 l

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

Se răcește la 50 °C și se adaugă o soluție apoasă sterilizată prin filtrare de clorură de 2,3,5-trifeniltetrazoliu (Sigma) pentru obținerea concentrației finale de 50 mg la litru.

(b) **Medii de creștere selective validate**

Mediu SMSA (Englebrecht, 1994, modificat de Elphinstone *et al.*, 1996)

Mediu de bază

Acizi casaminici (Difco)	1,0 g
Bacto-peptonă (Difco)	10,0 g
Glicerol	5,0 ml
Bacto-agar (Difco) (a se vedea *nota 2*)	15,0 g
Apă distilată	1,0 l

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

Se răcește la 50 °C și se adaugă soluții apoase concentrate, sterilizate prin filtrare, conținând următoarele ingrediente pentru obținerea concentrațiilor finale prevăzute:

Violet cristalizat (Sigma)	5 mg la litru
Sulfat de polimixină B (Sigma P-1004)	600 000 unități (circa 100 mg) la litru
Bacitracină (Sigma B-0125)	1 250 unități (circa 25 mg) la litru
Cloramfenicol (Sigma C-3175)	5 mg la litru
Penicilină-G (Sigma P-3032)	825 unități (circa 0,5 mg) la litru
Clorură de 2,3,5-trifeniltetrazoliu (Sigma)	50 mg la litru

Notă:

1. Utilizarea altor reactive decât cele menționate anterior poate afecta creșterea *R. solanacearum*.
2. Agarul de tip Oxoid nr. 1 poate fi utilizat în loc de Bacto-Agar (Difco). În acest caz, creșterea *R. solanacearum* va fi mai lentă, dar și creșterea bacteriilor saprofite concurente ar putea fi, de asemenea, redusă. Dezvoltarea coloniilor tipice de *R. solanacearum* poate dura o zi sau două în plus, iar colorația roșie poate fi mai puțin pronunțată decât în mediu de Bacto-Agar.
3. O creștere a concentrației de bacitracină la 2 500 de unități la litru poate reduce populațiile de bacterii concurente fără a perturba creșterea *R. solanacearum*.

Mediile și soluțiile concentrate de antibiotice se păstrează la 4 °C în întuneric și se folosesc în maximum o lună.

Trebuie asigurată absența condensului pe suprafața plăcilor înainte de utilizare.

A se evita uscarea excesivă a plăcilor.

După prepararea fiecărui lot nou de mediu de cultură, trebuie efectuat un control de calitate prin însămânțarea unei suspensii dintr-o cultură de referință de *R. solanacearum* (a se vedea apendicele 3) și observarea formării de colonii tipice după incubarea la 28 °C timp de 2-5 zile.

(c) **Medii de îmbogățire validate**

Mediu nutritiv SMSA (Elphinstone *et al.*, 1996)

Se prepară ca și pentru mediul selectiv SMSA, dar se elimină Bacto-Agar și clorura de 2-3-5-tetrazoliu.

Mediu nutritiv modificat Wilbrink (Caruso *et al.*, 2002)

Zaharoză	10 g
Proteoză peptonă	5 g
K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4$	0,25 g
$NaNO_3$	0,25 g
Apă distilată	1 l

Se sterilizează în autoclavă la 121 °C timp de 15 minute și se răcește la 50 °C.

Se adaugă soluții concentrate de antibiotice ca și pentru mediul nutritiv SMSA.

Apendicele 3

A. **Material de control standardizat disponibil în comerț**

(a) *Izolate de bacterii*

Următoarele izolate de bacterii se recomandă spre utilizare în calitate de material standard de referință sau control pozitiv (tabelul 1) sau pe parcursul optimizării testelor pentru a evita reacții încrucișate (tabelul 2). Toate sușele sunt disponibile în comerț la următoarele adrese:

1. National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPPB), Central Science Laboratory, York, UK.

2. Culture Collection of the Plant Protection Service (PD), Wageningen, Țările de Jos.

3. Collection française de bactéries phytopathogènes (CFBP), INRA – Station de phytobactériologie, Angers, Franța.

Tabelul 1. Gama de referință SMT de izolați de *R. solanacearum*

Cod NCPPB	SMT #	Alte coduri	Țara de origine	Biovar
NCPPB 4153	6	CFBP 4582, Pr 3020, EURS11	Egipt	2
NCPPB 4154	10	CFBP 4585, 550, EURS21	Turcia	2
NCPPB 3857	12	CFBP 4587, Pr 1140, EURS26	Anglia	2
NCPPB 1584	23	CFBP 4598, EURS49	Cipru	2
NCPPB 2505	24	CFBP 4599, EURS50	Suedia	2
NCPPB 4155	26	CFBP 4601, 502, EURS55	Belgia	2
NCPPB 4156 (*)	71 (*)	PD 2762, CFBP 3857	Țările de Jos	2
NCPPB 4157	66	LNPV 15.59	Franța	2
NCPPB 4158	39	CFBP 4608, Port 448, EURS80	Portugalia	2
NCPPB 4160	69	IVIA-1632-2	Spania	2
NCPPB 4161	76	B3B	Germania	2
NCPPB 325	41	CFBP 2047, KEL60-1, R842	Statele Unite	1
NCPPB 3967	42	CFBP 4610, R285, GONg7	Costa Rica	1
NCPPB 4028	43	CFBP 4611, R303/571, CIP310, SEQ205	Columbia	2
NCPPB 3985	44	CFBP 4612, R578, CIP312	Peru	2T
NCPPB 3989	45	CFBP 4613, R568, CIP226	Brazilia	2T
NCPPB 3996	46	CFBP 3928, R276/355, CIP72, SEQ225	Peru	3
NCPPB 3997	47	CFBP 4614, R280/363, CIP49, HAY0131a	Australia	3
NCPPB 4029	48	CFBP 4615, R297/349, CIP121, CMIb2861	Sri Lanka	4
NCPPB 4005	49	CFBP 4616, R470	Filipine	4
NCPPB 4011	50	CFBP 4617, R288, HEmps2	China	5

(*) A se utiliza ca sușă de referință standard biovarul 2 soiul 3 de *R. solanacearum*.

Notă: Autenticitatea sușelor menționate anterior poate fi garantată numai în cazul în care acestea sunt obținute dintr-o colecție de culturi autentice.

Tabelul 2. Gama de referință SMT de bacterii corelate serologic sau genetic în vederea utilizării pentru optimizarea testelor de detectare

Cod NCPPB	SMT #	Alt cod	Identificare
NCPPB 4162	51	CFBP 1954	*Bacillus polymyxa* (1)
NCPPB 4163	52	CFBP 1538	*Pseudomonas marginalis pv. marginalis* (1)
NCPPB 4164	—	CFBP 2227	*Burkholderia cepacia* (2)
NCPPB 4165	—	CFBP 2459	*Ralstonia pickettii* (2)
NCPPB 4166	58	CFBP 3567 CSL Pr1150	*Ralstonia pickettii* (1)
NCPPB 4167	60	CFBP 4618 PD 2778	*Ralstonia* sp. (1)
NCPPB 1127	53	CFBP 3575	*Burkholderia andropogonis* (1)
NCPPB 353	54	CFBP 3572	*Burkholderia caryophylli* (1)
NCPPB 945	55	CFBP 3569	*Burkholderia cepacia* (1)
NCPPB 3708	56	CFBP 3574	*Burkholderia glumae* (1)
NCPPB 3590	57	CFBP 3573	*Burkholderia plantarii* (1)
NCPPB 3726	59	CFBP 3568	*Banana Blood Disease Bacterium* (1) (2) (3)
NCPPB 4168	61	CFBP 4619 IPO S339	*Enterobacter* sp. (1)
NCPPB 4169	62	IPO 1695	*Enterobacter* sp (1)
NCPPB 4170	63	CFBP 4621 IPO S306	*Ochrobactrum anthropi* (1) (2)
NCPPB 4171	64	CFBP 4622 IPO 1693	*Curtobacterium* sp. (1) (2)
NCPPB 4172	65	IPO 1696a	*Pseudomonas* sp. (1)
NCPPB 4173	—	PD 2318	*Aureobacterium* sp. (2)
NCPPB 4174	81	IVIA 1844.06	*Flavobacterium* sp. (1) (2)

(1) Susă care poate să provoace în testele serologice (IF și/sau ELISA) o reacție încrucișată cu antiserurile policlonale.
(2) Susă din care poate fi amplificat produsul PCR în anumite laboratoare având dimensiuni asemănătoare celor preconizate la utilizarea primerilor specifici OLI-1 și Y-2 (a se vedea apendicele 6).
(3) Susceptibil să provoace o reacție încrucișată în majoritatea testelor, dar cunoscut ca fiind prezent numai pe banană în Indonezia.

b) *Material de control standardizat disponibil în comerț*

Următorul material de control standardizat poate fi obținut la colectarea culturilor NCPPB:

Granule liofilizate de extract din 200 tuberculi de cartof sănătoși în calitate de control negativ pentru ansamblul testelor.

Granule liofilizate de extract din 200 tuberculi de cartofi sănătoși conținând 10^3-10^4 și 10^4-10^6 celule de biovar 2 de *R. solanacearum* (de exemplu, susa NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) în calitate de control pozitiv pentru testele serologice și PCR. Întrucât liofilizarea afectează viabilitatea celulelor, acestea nu pot fi folosite drept control standard pentru testele de izolare sau testele biologice.

Suspensii fixate cu formalină de biovar 2 de *R. solanacearum* (susa NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) la 10^6 celule/ml în calitate de control pozitiv pentru testele serologice.

B. **Pregătirea controalelor pozitive și negative**

Se crește timp de 48 ore o susă virulentă de biovar 2 rasa 3 de *R. solanacearum* (de exemplu, susa NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) într-un mediu general SMSA și se face o suspensie într-un tampon fosfat 10 mM pentru a obține o densitate celulară de circa 2×10^8 ufc/ml. În general, aceasta se obține printr-o suspensie ușor tulbure echivalentă cu o densitate optică de 0,15-600 nm.

Se îndepărtează taloanele de la două sute de tuberculi prelevați de la o varietate de cartof cu coaja albă cunoscută ca fiind neinfectată cu *R. solanacearum*.

Taloanele se tratează după metoda obișnuită și se face o nouă suspensie de extract concentrat în 10 ml.

Se pregătesc zece microfiole sterile de 1,5 ml cu 900 µl de extract concentrat resuspendat.

Se introduc 100 µl din suspensia de *R. solanacearum* în prima microfiolă. Se omogenizează în agitator.

Se stabilesc niveluri decimale de contaminare continuând diluarea în următoarele cinci microfiole.

Cele șase microfiole contaminate vor fi utilizate drept control pozitiv. Cele patru microfiole necontaminate se vor folosi în calitate de control negativ. Se etichetează microfiolele în consecință.

Se prepară alicote de 100 µl în microfiole sterile de 1,5 ml pentru a obține nouă replici din fiecare eșantion de control. Se păstrează între – 16 și – 24 °C până la utilizare.

Prezența și nivelul *R. solanacearum* în eșantioanele de control trebuie confirmate în primul rând prin IF.

Pentru testul PCR, se efectuează o extragere de ADN din eșantioanele de control pozitiv și negativ pentru fiecare serie de eșantioane de testare.

Pentru testele IF și FISH, se efectuează teste asupra eșantioanelor de control pozitiv și negativ pentru fiecare serie de eșantioane de testare.

Pentru testele IF și FISH, *R. solanacearum* trebuie detectat în cel puțin 10^6 și 10^4 celule/ml de control pozitiv și în nici un eșantion de control negativ.

Apendicele 4

Tampoane pentru procedura de testare

Generalități: tampoanele sterilizate nedeschise pot fi păstrate până la un an.

1. **Tampoane pentru procedura de extracție**

1.1. Tampon de extracție (50 mM tampon fosfat, pH 7,0)

Acest tampon este utilizat pentru extracția bacteriei din țesuturile plantei prin omogenizare sau agitare.

Na_2HPO_4	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
Apă distilată	1, 00 l

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

Utilizarea următorilor compuși suplimentari poate fi utilă:

	Utilizare	Cantitate (la l)
Fulgi de Lubrol	Peptizant (*)	0,5 g
Silicon antispumant DC	Agent antispumant (*)	1,0 ml
Pirofosfat tetrasodic	Antioxidant	1,0 g
Polivinilpirolidonă-40000 (PVP-40)	Legarea inhibitorilor PCR	50 g

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

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

Acest tampon este utilizat pentru resuspendarea și diluția extractelor de taloane de tuberculi de cartof ca urmare a concentrării în extract concentrat prin centrifugare.

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	0,4 g
Apă distilată	1,0 l

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

2. **Tampoane pentru testul de imunofluorescență**

2.1. Tampon IF: 10 mM PBS, pH 7,2

Acest tampon este utilizat pentru diluarea anticorpilor.

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	0,4 g
NaCl	8,0 g
Apă distilată	1,0 l

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

2.2. Tampon IF-Tween

Acest tampon este utilizat pentru spălarea lamelor.

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

2.3. Glicerol tamponat fosfatic, pH 7,6

Acest tampon este utilizat ca fluid de suport la ferestrele lamei IF pentru mărirea fluorescenței.

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	3,2 g
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	0,15 g
Glicerol	50 ml
Apă distilată	100 ml

În comerț sunt disponibile soluții suport antidecolorare, de exemplu, Vectashield® (Vector Laboratories) sau Citifluor® (Leica).

3. **Tampoane pentru testul ELISA indirect**

3.1. Tampon de acoperire dublu concentrat, pH 9,6

Na_2CO_3	6,36 g
$NaHCO_3$	11,72 g
Apă distilată	1, 00 l

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

Poate fi adăugat sulfit de sodiu (0,2 %) ca antioxidant pentru a împiedica constituirea de compuși aromatici oxidați.

3.2. 10X tampon de fosfat salin (PBS), pH 7,4

NaCl	80,0 g
KH_2PO_4	2,0 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	29,0 g
KCl	2,0 g
Apă distilată	1,0 l

3.3. PBS-Tween

10X PBS	100 ml
10 % Tween 20	5 ml
Apă distilată	895 ml

3.4. Tampon de blocare (anticorpi) (trebuie preparat proaspăt)

10X PBS	10,0 ml
Polivinilpirolidonă-44000 (PVP-44)	2,0 g
10 % Tween 20	0,5 ml
Lapte praf	0,5 g
Apă distilată	până la 100 ml

3.5. Soluție de substrat de fosfatază alcalină, pH 9,8

Dietanolamină	97 ml
Apă distilată	800 ml

Se amestecă și se ajustează la pH 9,8 cu acid clorhidric (HCl) concentrat.

Se adaugă apă distilată până la 1 litru.

Se adaugă 0,2 g $MgCl_2$.

Se dizolvă două tablete de 5 mg de substrat de fosfatază (Sigma) la 15 ml de soluție.

4. **Tampoane pentru testul DASI ELISA**

4.1. Tampon de acoperire dublu concentrat, pH 9,6

Na_2CO_3	1,59 g
$NaHCO_3$	2,93 g
Apă distilată	1 000 ml

Se dizolvă ingredientele și se verifică pH-ul.

4.2. 10X tampon de fosfat salin (PBS), pH 7,2-7,4

NaCl	80,0 g
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	4,0 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	27,0 g
Apă distilată	1 000 ml

4.3. PBS-Tween

10X PBS	50 ml
10 % Tween 20	5 ml
Apă distilată	950 ml

4.4. Tampon de substrat, pH 9,8

Dietanolamină	100 ml
Apă distilată	900 ml

Se amestecă și se ajustează la pH 9,8 cu acid clorhidric (HCl).

Apendicele 5

Stabilirea gradului de contaminare în testele IF și FISH

1. Se calculează numărul mediu de celule fluorescente tipice pe câmp (c).

2. Se calculează numărul de celule fluorescente tipice pe fereastră de lamă de microscop (C).

$C = c \times S/s$

unde S = suprafața (S) a ferestrei lamei cu multe godeuri

și s = suprafața (s) a câmpului obiectivului

$s = \pi i^2/4G^2K^2$ unde i = coeficientul de câmp (depinde de tipul ocularului și variază de la 8 la 24)

K = coeficientul tubului (1 sau 1,25)

G = grosisment (de 100 de ori, 40 de ori etc.) obiectiv.

3. Se calculează numărul de celule fluorescente tipice pe ml de extract concentrat resuspendat (N).

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

unde y = volumul de extract concentrat resuspendat per fereastră

și F = factorul de diluție al extractului concentrat resuspendat

Apendicele 6

Protocoale PCR și reactivi validați

Notă: Testele preliminare trebuie să permită detectarea reproductibilă a 10^3-10^4 celule de *R. solanacearum* pe ml de extract de eșantion.

De asemenea, testele preliminare nu trebuie să indice rezultate pozitive false cu o gamă de sușe bacteriene selecționate (a se vedea apendicele 3).

1. **Protocolul PCR Seal *et al.* (1993)**

1.1. Secvența de primer de oligonucleotide

Primer sens OLI-1 5′-GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC-3′

Primer antisens Y-2 5′-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3′

Dimensiunea prevăzută a amplimerului matricei ADN de *R. solanacearum* = 288 bp

1.2. Amestecul reactiv pentru PCR

Reactiv	Cantitate per reacție	Concentrație finală
Apă ultrapură sterilă	17,65 µl	
Tampon PCR × 10 (1) (15 mM $MgCl_2$)	2,5 µl	1 × (1,5 mM $MgCl_2$)
Amestec dNTP (20 mM)	0,25 µl	0,2 mM
Primer OLI-1 (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Primer Y-2 (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Polimerază Taq (5 U/µl) (1)	0,1 µl	0,5 U
Volumul eșantionului	2,0 µl	
Volum total	25 µl	

(1) Metoda a fost validată prin polimerază Taq de PerkinElmer (AmpliTaq) și Gibco BRL.

1.3. Condițiile reacției PCR

Se urmează procedura:

1 ciclu de:	(i)	2 minute la 96 °C: denaturarea matricei ADN
35 cicluri de:	(ii)	20 secunde la 94 °C: denaturarea matricei ADN
	(iii)	20 secunde la 68 °C: hibridizare cu primeri
	(iv)	30 secunde la 72 °C: extinderea ADN suplimentar
1 ciclu de:	(v)	10 minute la 72 °C (extinderea finală)
	(vi)	Se menține la 4 °C.

Notă: Acest program a fost optimizat pentru o utilizare cu ciclorul termic PerkinElmer 9600. Poate fi necesară o modificare a duratei ciclurilor (ii), (iii) și (iv) pentru o utilizare cu alte modele.

1.4. Analiza restricției enzimatice a amplimerului

Fragmentele PCR amplificate de ADN de *R. solanacearum* produc un polimorfism distinct al dimensiunii fragmentelor de restricție după incubare la 37 °C cu enzima *Ava* II.

2. **Protocolul PCR Pastrik & Maiss (2000)**

2.1. Secvența de primer de oligonucleotide

Primer sens Ps-1 5′-agt cga acg gca gcg ggg g-3′

Primer antisens Ps-2 5′-ggg gat ttc aca tcg gtc ttg ca-3′

Dimensiunea prevăzută a amplimerului matricei ADN de *R. solanacearum* = 553 bp.

2.2. Amestecul reactiv pentru PCR

Reactiv	Cantitate per reacție	Concentrație finală
Apă ultrapură sterilă	16,025 µl	
Tampon PCR × 10 (1)	2,5 µl	1 × (1,5 mM $MgCl_2$)
BSA (fracțiune V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
Amestec dNTP (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer Ps-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Primer Ps-2 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Polimerază Taq (5 U/µl) (1)	0,1 µl	0,5 U
Volumul eșantionului	5,0 µl	
Volum total	25,0 µl	

(1) Metodele au fost validate prin polimerază Taq de PerkinElmer (AmpliTaq) și Gibco BRL.

Notă: Optimizată inițial pentru ciclorul termic MJ Research PTC 200 prin polimerază Taq Gibco. AmpliTaq de PerkinElmer și tamponul pot fi utilizate, de asemenea, la aceleași niveluri de concentrație.

2.3. Condițiile reacției PCR

Se urmează procedura:

1 ciclu de:	(i)	5 minute la 95 °C: denaturarea matricei ADN
35 cicluri de:	(ii)	30 secunde la 95 °C: denaturarea matricei ADN
	(iii)	30 secunde la 68 °C: hibridizare cu primeri
	(iv)	45 secunde la 72 °C: extinderea ADN suplimentar
1 ciclu de:	(v)	5 minute la 72 °C (extinderea finală)
	(vi)	Se menține la 4 °C.

Notă: Acest program a fost optimizat pentru o utilizare cu ciclorul termic MJ Research PTC 200. Poate fi necesară o modificare a duratei ciclurilor (ii), (iii) și (iv) pentru o utilizare cu alte modele.

2.4. Analiza restricției enzimatice a amplimerului

Produsele PCR amplificate de ADN de *R. solanacearum* produc un polimorfism distinct al dimensiunii fragmentelor de restricție după incubare la 65 °C cu enzima *Taq I* timp de 30 de minute. Fragmentele de restricție obținute din fragmentul specific de *R. solanacearum* au o lungime de 457 bp și de 96 bp.

3. **Protocolul PCR compus, cu control intern al PCR (Pastrik *et al.*, 2002)**

3.1. Secvența de primer de oligonucleotide

Primer sens Rs-1-F 5′-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3′

Primer antisens Rs-1-R 5′-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3′

Primer sens Ns-5-F 5′-AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G-3′

Primer antisens Ns-6-R 5′-GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC-3′

Dimensiunea prevăzută a amplimerului matricei ADN de *R. solanacearum* = 718 bp (în prezența primerului Rs)

Dimensiunea prevăzută a amplimerului controlului intern al PCR de 18S ARNr = 310 bp (în prezența primerului Ns)

3.2. Amestecul reactiv pentru PCR

Reactiv	Cantitate per reacție	Concentrație finală
Apă ultrapură sterilă	12,625 µl	
Tampon PCR × 10 (1) (1,5 mM $MgCl_2$)	2,5 µl	1 × (1,5 mM $MgCl_2$)
BSA (fracțiune V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
Amestec dNTP (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer Rs-1-F (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Primer Rs-1-R (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Primer Ns-5-F (10 µM) (2)	0,15 µl	0,06 µM
Primer Ns-6-R (10 µM) (2)	0,15 µl	0,06 µM
Polimerază Taq (5 U/µl) (1)	0,2 µl	1,0 U
Volumul eșantionului	5,0 µl	
Volum total	25,0 µl	

(1) Metodele au fost validate prin polimerază Taq de PerkinElmer (AmpliTaq) și Gibco BRL.

(2) Concentrațiile primerilor Ns-5-F și Ns-6-R au fost optimizate pentru extracția miezurilor de taloane de cartof prin metoda de omogenizare și purificare a ADN Pastrik (2000) (a se vedea secțiunea VI.A.6.1.a). Va fi nevoie de o nouă optimizare a concentrațiilor de reactivi în cazul în care se aplică extracția prin agitare sau prin alte metode de izolare a ADN.

3.3. Condițiile reacției PCR

Se urmează procedura:

1 ciclu de:	(i)	5 minute la 95 °C: denaturarea matricei ADN
35 cicluri de:	(ii)	30 secunde la 95 °C: denaturarea matricei ADN
	(iii)	30 secunde la 58 °C: hibridizare cu primeri
	(iv)	45 secunde la 72 °C: extinderea ADN suplimentar
1 ciclu de:	(v)	5 minute la 72 °C (extinderea finală)
	(vi)	Se menține la 4 °C.

Notă: Acest program a fost optimizat pentru o utilizare cu ciclorul termic MJ Research PTC 200. Poate fi necesară o modificare a duratei ciclurilor (ii), (iii) și (iv) pentru utilizarea cu alte modele.

3.4. Analiza restricției enzimatice a amplimerului

Produsele PCR amplificate de ADN de *R. solanacearum* produc un polimorfism distinct al dimensiunii fragmentelor de restricție după incubare la 65 °C cu enzima *Bsm* Isau un izoschizomer (de exemplu, Mva 1269 I) timp de 30 de minute.

4. **Protocolul PCR specific biovarului de *R. solanacearum* (Pastrik *et al.*, 2001)**

4.1. Secvența de primer de oligonucleotide

Primer sens Rs-1-F	5′-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3′
Primer antisens Rs-1-R	5′-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3′
Primer antisens Rs-3-R	5′-TTC ACG GCA AGA TCG CTC-3′

Dimensiunea prevăzută a amplimerului matricei ADN de *R. solanacearum*:

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

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

4.2. Amestecul reactiv pentru PCR

(a) PCR specific biovarului 1/2

Reactiv	Cantitate per reacție	Concentrație finală
Apă ultrapură sterilă	12,925 µl	
Tampon PCR × 10 (1)	2,5 µl	1 × (1,5 mM $MgCl_2$)
BSA (fracțiune V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
Amestec dNTP (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer Rs-1-F (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Primer Rs-1-R (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Polimerază Taq (5 U/µl) (1)	0,2 µl	1 U
Volumul eșantionului	5,0 µl	
Volum total	25,0 µl	

(1) Metodele au fost validate prin polimerază Taq PerkinElmer (AmpliTaq) și Gibco BRL.

(b) PCR specific biovarului 3/4/5

Reactiv	Cantitate per reacție	Concentrație finală
Apă ultrapură sterilă	14,925 µl	
Tampon PCR × 10 (1)	2,5 µl	1 × (1,5 mM $MgCl_2$)
BSA (fracțiune V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
Amestec dNTP (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer Rs-1-F (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Primer Rs-3-R (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Polimerază Taq (5 U/µl) (1)	0,2 µl	1 U
Volumul eșantionului	5,0 µl	
Volum total	25,0 µl	

(1) Metodele au fost validate prin polimerază Taq PerkinElmer (AmpliTaq) și Gibco BRL.

4.3. Condițiile reacției PCR

Se urmează procedura descrisă în continuare pentru reacțiile specifice biovarului 1/2 și biovarului 3/4/5:

1 ciclu de:	(i)	5 minute la 95 °C: denaturarea matricei ADN
35 cicluri de:	(ii)	30 secunde la 95 °C: denaturarea matricei ADN
	(iii)	30 secunde la 58 °C: hibridizare cu primeri
	(iv)	45 secunde la 72 °C: extinderea ADN suplimentar
1 ciclu de:	(v)	5 minute la 72 °C (extinderea finală)
	(vi)	Se menține la 4 °C.

Notă: Acest program a fost optimizat pentru o utilizare cu ciclorul termic MJ Research PTC 200. Poate fi necesară o modificare a duratei ciclurilor (ii), (iii) și (iv) pentru utilizarea cu alte modele.

4.4. Analiza restricției enzimatice a amplimerului

Produsele PCR amplificate de ADN de *R. solanacearum* utilizând primerii Rs-1-F și Rs-1-R produc un polimorfism distinct al dimensiunii fragmentelor de restricție după incubare la 65 °C cu enzima *Bsm* I sau un izoschizomer (de exemplu, Mva 1269 I) timp de 30 de minute. Produsele PCR amplificate de ADN de *R. solanacearum* utilizând primerii Rs-1-F și Rs-3-R nu au puncte de restricție.

5. **Prepararea tamponului de încărcare**

5.1. Albastru de bromfenol (**soluție concentrată** de 10 %)

Albastru de bromfenol	5 g
Apă distilată (bidest)	50 ml

5.2. Tampon de încărcare

Glicerol (86 %)	3,5 ml
Albastru de bromfenol (5.1)	300 µl
Apă distilată (bidest)	6,2 ml

6. **Tampon triacetat EDTA (TAE) 10 x, pH 8,0**

Tampon TRIS	48,40 g
Acid acetic glacial	11,42 ml
EDTA (sare disodică)	3,72 g
Apă distilată	1,00 l

Înainte de utilizare se diluează până la 1 x.

De asemenea, este disponibil în comerț (de exemplu, Invitrogen sau echivalent).

Apendicele 7

Reactivi validați pentru testul FISH

1. **Oligosonde**

Sondă OLI-1-CY3 specifică *R. solanacearum*: 5′-ggc agg tag caa gct acc ccc-3′

Sondă eubacteriană EUB-338-FITC nespecifică: 5′-gct gcc tcc cgt agg agt-3′

2. **Soluția de fixare**

[ATENȚIE! FIXATIVUL CONȚINE PARAFORMALDEHIDĂ, CARE ESTE TOXICĂ. SE POARTĂ MĂNUȘI ȘI NU SE INHALEAZĂ. SE RECOMANDĂ SĂ SE LUCREZE ÎNTR-O HOTĂ CHIMICĂ.]

(i) Se încălzesc 9 ml de apă pentru biologie moleculară (de exemplu, apă ultrapură) la circa 60 °C și se adaugă 0,4 g de paraformaldehidă. Paraformaldehida se dizolvă după adăugarea a cinci picături de 1N NaOH și amestecarea cu un agitator magnetic.

(ii) Se ajustează pH-ul la 7,0 prin adăugarea a 1 ml de tampon fosfat 0,1 M (PB; pH 7,0) și cinci picături de 1 N HCl. Se verifică pH-ul cu benzi indicatoare și se ajustează, atunci când este necesar, cu HCl sau NaOH. *[ATENȚIE! NU SE FOLOSEȘTE PH-METRUL ÎN SOLUȚII CARE CONȚIN PARAFORMALDEHIDĂ.]*

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

3. **Hibmix 3 x**

NaCl	2,7 M
Tris/HCl	60 mM (pH 7,4)
EDTA (filtru sterilizat în autoclavă)	15 mM

Se diluează până la 1 x, după cum este prevăzut.

4. **Soluție de hibridizare**

Hibmix 1 x	
Dodecilsulfat de sodiu (DSS)	0,01 %
Formamidă	30 %
Sondă EUB 338	5 ng/μl
Sondă OLI-1 sau OLI-2	5 ng/μl

Se prepară cantități de soluție de hibridizare în conformitate cu calculul din tabelul 1. Pentru fiecare lamă (conținând două dubluri de eșantioane diferite), este nevoie de 90 μl de soluție de hibridizare. *IMPORTANT: FORMAMIDA ESTE FOARTE TOXICĂ. PRIN URMARE, SE POARTĂ MĂNUȘI ȘI SE IAU MĂSURILE DE SIGURANȚĂ NECESARE!*

Tabelul 1. Cantități recomandate pentru prepararea amestecului de hibridizare

Numărul de lame	1	4	6	8	10
Apă ultrapură sterilă	23,1	92,4	138,6	184,8	231,0
Hibmix 3X	30,0	120,0	180,0	240,0	300,0
Dodecilsulfat de sodiu (DSS) de 1 %	0,9	3,6	5,4	7,2	9,0
Formamidă	27,0	108,0	162,0	216,0	270,0
Sondă EUB 338 (100 ng/μl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Sondă OLI-1 sau OLI-2 (100 ng/μl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Volum total (μl)	90,0	360,0	540,0	720,0	900,0

Notă: Toate soluțiile care conțin oligosonde sensibile la lumină se păstrează în întuneric, la – 20 °C. Se protejează de lumina directă a soarelui sau de lumina electrică directă în timpul utilizării.

5. **Tampon M fosfat 0,1 M, pH 7,0**

Na_2HPO_4	8,52 g
KH_2PO_4	5,44 g
Apă distilată	1,00 l

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

Apendicele 8

Condiții de cultură pentru vinete și tomate

Se plantează semințe de tomate (*Lycopersicon esculentum*) și de vinete (*Solanum melongena*) în pământ de seră pasteurizat. Se răsădesc plantulele în pământ pentru flori pasteurizat atunci când cotiledoanele sunt dezvoltate în totalitate (10-14 zile).

Vinetele sau tomatele trebuie cultivate în seră, înainte de inoculare, în următoarele condiții de mediu:

Durata zilei:	14 ore sau durata naturală a zilei atunci când este mai mare
Temperatura:	ziua: 21-24 °C noaptea: 14-18 °C
Varietatea sensibilă de tomată:	«Moneymaker»
Varietatea sensibilă de vânătă:	«Black Beauty»
Furnizori:	a se vedea website-ul http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

Referințe

1. Amann, R.I., L. Krumholz and D.A. Stahl. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. J. Bacteriol. 172: 762-770.

2. Anon. 1998. Council Directive 98/57/EC of 20 July 1998 on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al*. Official Journal of the European Communities L235, 1-39.

3. Boudazin, G., A.C. Le Roux, K. Josi, P. Labarre and B. Jouan. 1999. Design of division specific primers of *Ralstonia solanacearum* and application to the identification of European isolates. European Journal of Plant Pathology 105; 373-380.

4. Caruso, P., Gorris, M.T., Cambra, M., Palomo, J.L., Collar, J and Lopez, M.M. 2002. Enrichment Double-Antibody Sandwich Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay That Uses a Specific Monoclonal Antibody for sensitive Detection of *Ralstonia solanacearum* in Asymptomatic Potato Tubers. Applied and Environmental Microbiology, 68, 3634-3638.

5. Cook, D., Barlow, E. and Sequeira, L. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. Molecular Plant-Microbe Interactions 1:113-121.

6. Elphinstone, J.G., Hennessy, J., Wilson, J.K. and Stead, D.E. 1996. Sensitivity of detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. EPPO Bulletin 26; 663-678.

7. Englebrecht, M.C. (1994) Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. In: A.C. Hayward (ed.) Bacterial Wilt Newsletter 10, 3-5. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.

8. Hayward, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Applied Bacteriology 27; 265-277.

9. Hayward, A.C., El-Nashaar, H.M., Nydegger, U. and De Lindo, L. 1990. Variation in nitrate metabolism in biovars of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Applied Bacteriology 69; 269-280.

10. Ito, S., Y. Ushijima, T. Fujii, S. Tanaka, M. Kameya-Iwaki, S. Yoshiwara and F. Kishi. 1998. Detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in soil using a semi-selective medium and a PCR technique. J. Phytopathology 146; 379-384.

11. Janse, J.D. (1988) A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 18, 343-351.

12. Janse, J.D. 1991. Infra- and intra-specific classification of *Pseudomonas solanacaerum* strains using whole cell fatty-acid analysis. Systematic and Applied Microbiology 14; 335-345.

13. Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology 44; 693-695.

14. Klement Z.; Rudolph, K and D.C. Sands, 1990. Methods in Phytobacteriology. Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 pp.

15. Lelliott, R.A. and Stead, D.E. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Blackwell scientific Publications Ltd., Oxford. 216 pp.

16. Lopez, M.M., Gorris, M.T., Llop, P., Cubero, J., Vicedo, B., Cambra, M., 1997. Selective enrichment improves selective isolation, serological and molecular detection of plant pathogenic bacteria. In: H.W. Dehne *et al*., (eds). Klewer Academic Publishers. pp. 117-121.

17. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J., 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic Xanthomonas and Pseudomonas pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. Applied and Environmental Microbiology, 60, 2286-2295.

18. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Phytopathology 85; 528-536.

19. Opina, N., F. Tavner, G. Holloway, J.-F Wang, T.-H Li, R. Maghirang, M. Fegan, A.C. Hayward, V. Krishnapillai, W.F. Hong, B.W. Holloway, J.N. Timmis. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). As Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol. 5; 19-33.

20. Pastrik, K.H. and Maiss, E. 2000. Detection of *R. solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. J. Phytopathology 148; 619-626.

21. Pastrik, K.H., Elphinstone, J.G. and Pukall, R. 2002. Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification of 16S-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control. European Journal of Plant Pathology 108, 831-842.

22. Robinson-Smith, A., Jones, P., Elphinstone, J.G. and Forde, S.M.D. (1995) Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. Food and Agricultural Immunology 7, 67-79.

23. Schaad, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Schaad [Hrsg.]. - 3. ed.; St. Paul, Minnesota: 373 pp.

24. Seal, S.E., L.A. Jackson, J.P.W. Young, and M.J. Daniels. 1993. Detection of *Pseudomonas solanacearum, Pseudomonas syzygii, Pseudomonas pickettii* and Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. J. Gen. Microbiol. 139: 1587-1594.

25. Smith, J.J., Offord, L.C., Holderness, M. and Saddler, G.S. 1995. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. Applied and Environmental Microbiology 61; 4262-4268.

26. Stead, D.E. 1992. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty-acid profiles. International Journal of Systematic Bacteriology 42; 281-295.

27. Taghavi, M., Hayward, A.C., Sly, L.I., Fegan, M. 1996. Analysiss of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum, Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. International Journal of Systematic Bacteriology 46; 10-15.

28. Van Der Wolf, J.M., Bonants, P.J.M., Smith, J.J., Hagenaar, M., Nijhuis, E., Van Beckhoven, J.R.C., Saddler, G.S., Trigalet, A., Feuillade, R. 1998. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* Race 3 in Western Europe as determined by AFLP, RC-PFGE and rep-PCR. In: Prior, P., Allen, C. and Elphinstone, J. (eds.) Bacterial wilt disease: Molecular and Ecological Aspects. Springer (Berlin) pp. 44-49.

29. Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N., Stead, D.E. and Boonham, N. 1999. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains using an automated and quantitative flourogenic 5′ nuclease TaqMan assay. Applied and Environmental Microbiology 66; 2853-2858.

30. Wullings, B.A., A.R. van Beuningen, J.D. Janse and A.D.L. Akkermans. 1998. Detection of R. *solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent in situ hybridization with 23s rRNA-targeted probes. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4546-4554.

ANEXA III

1. Pentru fiecare apariție suspectată pentru care a fost identificat un rezultat pozitiv în testul sau testele de selecție în conformitate cu metodele prevăzute în anexa II pentru materialul vegetal menționat și în toate celelalte cazuri, pentru care este așteptată confirmarea sau infirmarea, ar trebui să se păstreze și să se conserve în mod corespunzător, până la finalizarea metodelor respective:

   — toți tuberculii care fac parte din eșantion și, în măsura în care este posibil, toate plantele care fac parte din eșantion;

   — orice rest de extract și material preparat suplimentar pentru testul sau testele de selecție, de exemplu lamele preparate pentru testele de imunofluorescență și

   — toată documentația relevantă.

   Conservarea tuberculilor va permite, după caz, testarea varietăților.

2. În cazul confirmării prezenței organismului, ar trebui să se păstreze și să se conserve în condiții corespunzătoare, timp de cel puțin o lună după procedura de notificare prevăzută la articolul 5 alineatul (2):

   — materialul prevăzut la punctul 1 și

   — un eșantion din tomata sau vânăta contaminată inoculată cu extractul de tubercul sau plantă, după caz, și

   — cultura izolată a organismului.

ANEXA IV

Elementele din ancheta prevăzută la articolul 5 alineatul (1) litera (a) punctul (i) includ, atunci când sunt relevante:

(i) locurile de producție:

— care cultivă sau au cultivat cartofi care sunt înrudiți prin clonare cu cartofi depistați ca fiind contaminați cu organismul;

— care cultivă sau au cultivat tomate care sunt din aceeași sursă ca tomatele depistate ca fiind contaminate cu organismul;

— care cultivă sau au cultivat cartofi sau tomate care au fost puse sub control oficial datorită apariției suspectate a organismului;

— care cultivă sau au cultivat cartofi care sunt înrudiți prin clonare cu cartofi care au fost cultivați în locuri de producție depistate ca fiind contaminate cu organismul;

— care cultivă cartofi sau tomate și care sunt situate în vecinătatea unor locuri de producție contaminate, mai ales acele locuri care folosesc împreună material și instalații de producție fie direct, fie indirect prin intermediul unui contractant comun;

— care utilizează pentru irigare sau tratare prin pulverizare ape de suprafață din orice sursă confirmată sau suspectată a fi contaminată cu organismul;

— care utilizează pentru irigare sau tratare prin pulverizare ape de suprafață dintr-o sursă folosită în comun cu locuri de producție confirmate sau suspectate a fi contaminate cu organismul;

— care sunt sau au fost inundate cu ape de suprafață confirmate sau suspectate a fi contaminate cu organismul

și

(ii) ape de suprafață utilizate la irigare sau tratare prin pulverizare sau care au inundat unul sau mai multe câmpuri sau locuri de producție confirmate ca fiind contaminate cu organismul respectiv.

ANEXA V

1. Elementele care determină amploarea răspândirii probabile în conformitate cu articolul 5 alineatul (1) litera (a) punctul (iii) și litera (c) punctul (iii) includ:

— materialul vegetal enumerat cultivat într-un loc de producție declarat ca fiind contaminat în conformitate cu articolul 5 alineatul (1) litera (a) punctul (ii);

— locul sau locurile de producție care au legătură cu materialul vegetal enumerat declarat ca fiind contaminat în conformitate cu articolul 5 alineatul (1) litera (a) punctul (ii), inclusiv cele care folosesc împreună echipamente și instalații de producție fie direct, fie printr-un contractant comun;

— materialul vegetal enumerat produs în locul sau locurile de producție prevăzute la liniuța precedentă sau prezent în aceste locuri de producție în timpul perioadei în care materialul vegetal enumerat declarat ca fiind contaminat în conformitate cu articolul 5 alineatul (1) litera (a) punctul (ii) a fost prezent la locul de producție prevăzut la prima liniuță;

— depozitele care manipulează materialul vegetal enumerat provenit din locurile de producție menționate la liniuțele precedente;

— orice material, vehicul, clădire, depozit sau unități ale acestora, precum și orice alt obiect, inclusiv materialul de ambalare, care ar fi putut intra în contact cu materialul vegetal enumerat declarat ca fiind contaminat în conformitate cu articolul 5 alineatul (1) litera (a) punctul (ii);

— oricare material vegetal enumerat depozitat sau în contact cu oricare dintre echipamentele sau obiectele menționate la liniuța precedentă, înainte de curățarea și decontaminarea acestora;

— ca rezultat al anchetei și testărilor în conformitate cu articolul 5 alineatul (1) litera (a) punctul (i), în cazul cartofilor, acei tuberculi sau plante cu o legătură clonală sau parentală și, în cazul tomatei, plantele cu aceeași sursă ca materialul vegetal enumerat declarat ca fiind contaminat în conformitate cu articolul 5 alineatul (1) litera (a) punctul (ii) și pentru care apare probabilă contaminarea printr-o legătură clonală, deși rezultatele testării privind prezența organismului pot să fi fost negative. Se poate efectua un test de identificare a varietății pe tuberculii sau plantele contaminate;

— locul sau locurile de producție a materialului vegetal enumerat prevăzut la liniuța precedentă;

— locul sau locurile de producție a materialului vegetal enumerat care utilizează pentru irigare sau tratare prin pulverizare ape care au fost declarate ca fiind contaminate în conformitate cu articolul 5 alineatul (1) litera (c) punctul (ii);

— materialul vegetal enumerat produs în câmpurile inundate cu ape de suprafață confirmate ca fiind contaminate cu organismul.

2. Determinarea unei posibile răspândiri în conformitate cu articolul 5 alineatul (1) litera (a) punctul (iv) și litera (c) punctul (iii) include:

(i) în cazurile prevăzute la articolul 5 alineatul (1) litera (a) punctul (iv),

— proximitatea altor locuri de producție care cultivă materialul vegetal enumerat;

— producția și utilizarea comună a stocurilor de cartofi de sămânță;

— locurile de producție care utilizează ape de suprafață pentru irigarea sau tratarea prin pulverizare a materialului vegetal enumerat, în cazurile în care există sau a existat riscul de scurgere a apelor de suprafață dintr-unul sau mai multe locuri de producție declarate ca fiind contaminate în conformitate cu articolul 5 alineatul (1) litera (a) punctul (ii) sau un risc de inundare cu acestea;

(ii) în cazurile în care apele de suprafață au fost declarate ca fiind contaminate în conformitate cu articolul 5 alineatul (1) litera (c) punctul (ii):

— locul sau locurile de producție care produc materialul vegetal enumerat adiacente sau în pericol de a fi inundate de aceste ape de suprafață declarate ca fiind contaminate;

— orice bazin de irigare delimitat, asociat cu ape de suprafață declarate ca fiind contaminate;

— întinderile de apă legate cu apele de suprafață declarate ca fiind contaminate, ținând seama de:

— direcția și nivelul debitului apei declarate ca fiind contaminată;

— prezența plantelor gazdă sălbatice din familia solanaceelor.

3. Notificarea prevăzută la articolul 5 alineatul (2) primul paragraf include:

— imediat după confirmarea prezenței organismului prin teste de laborator, în conformitate cu metodele prevăzute în anexa II, cel puțin:

— pentru cartofi:

(a) denumirea varietății lotului;

(b) tipul (consum, sămânță etc.) și, după caz, categoria seminței;

— pentru plantele de tomate, denumirea varietății lotului și, după caz, categoria;

— fără a aduce atingere condițiilor de notificare a unei apariții suspecte a organismului prevăzute la articolul 4 alineatul (3), statul membru în care a fost confirmată apariția, în cazul în care există riscul de contaminare a materialului vegetal enumerat provenit din alt stat membru sau alte state membre sau având ca destinație alt stat membru sau alte state membre, comunică de îndată statului membru respectiv sau statelor membre respective informațiile necesare pentru a se conforma dispozițiilor articolului 5 alineatul (3), și anume:

(a) denumirea varietății lotului de cartofi sau tomate;

(b) numele și adresele expeditorului și ale destinatarului;

(c) data de livrare a lotului de cartofi sau tomate;

(d) mărimea lotului de cartofi sau tomate livrat;

(e) o copie a pașaportului fitosanitar sau, după caz, cel puțin numărul pașaportului fitosanitar sau, după caz, numărul de înregistrare al producătorului sau al distribuitorului și o copie a bonului de livrare.

Statele membre informează de îndată Comisia cu privire la comunicarea acestor informații.

4. Detaliile notificării suplimentare prevăzute la articolul 5 alineatul (2) al doilea paragraf includ:

După finalizarea tuturor investigațiilor, pentru fiecare caz:

(a) data la care a fost confirmată contaminarea;

(b) o scurtă descriere a investigațiilor efectuate pentru a identifica sursa și răspândirea posibilă a contaminării, inclusiv nivelul de eșantionare practicat;

(c) informații privind sursa sau sursele identificate sau prezumtive de contaminare;

(d) precizări privind amploarea contaminării declarate, inclusiv numărul de locuri de producție și, pentru cartofi, numărul de loturi cu indicarea varietății și, în cazul cartofilor de sămânță, categoria acestora;

(e) precizări privind delimitarea zonei, inclusiv numărul de locuri de producție nedeclarate ca fiind contaminate, dar incluse în zonă;

(f) precizări privind apele declarate ca fiind contaminate, inclusiv numele și amplasarea masei de apă și amploarea declarației/interdicției de irigare;

(g) pentru orice transport sau lot de plante de tomate declarat ca fiind contaminat, certificatele prevăzute la articolul 13 alineatul (1) punctul (ii) din Directiva 2000/29/CE și numărul pașaportului, în conformitate cu lista prevăzută în partea A capitolul I punctul 2.2 din anexa V la Directiva 2000/29/CE;

(h) orice alte informații privind focarul confirmat pe care Comisia ar putea să le solicite.

ANEXA VI

1. Dispozițiile articolului 6 alineatul (1) sunt următoarele:

— utilizarea ca hrană pentru animale după tratament termic, astfel încât să nu existe riscul supraviețuirii organismului

sau

— eliminarea într-un loc de eliminare a deșeurilor aprobat în mod oficial unde nu există nici un risc identificabil de răspândire a organismului în mediu, de exemplu, prin infiltrarea în terenurile agricole sau prin contactul cu corpuri de apă care ar putea fi utilizate pentru irigarea terenurilor agricole

sau

— incinerare

sau

— prelucrare industrială prin livrare directă și imediată către o întreprindere de prelucrare cu instalații de eliminare a deșeurilor aprobate oficial pentru care s-a stabilit că nu există nici un risc identificabil de răspândire a organismului și care dispune de un sistem de curățare și dezinfectare cel puțin a vehiculelor care părăsesc incinta întreprinderii

sau

— alte măsuri, cu condiția să se fi stabilit că nu există nici un risc identificabil de răspândire a organismului; aceste măsuri sunt notificate de îndată Comisiei și celorlalte state membre.

Orice deșeu rămas, legat de procesele menționate anterior și care rezultă din acestea, trebuie eliminat în conformitate cu metodele autorizate oficial prevăzute în anexa VII la prezenta directivă.

2. Utilizarea sau eliminarea corespunzătoare a materialului vegetal enumerat prevăzut la articolul 6 alineatul (2), sub controlul organismelor oficiale competente ale statului membru sau ale statelor membre în cauză, cu o comunicare corespunzătoare între organismele oficiale competente, astfel încât să se asigure acest control în orice moment, precum și aprobarea, de către organismul oficial competent al statului membru în care cartofii urmează să fie ambalați sau prelucrați, a instalațiilor de eliminare a deșeurilor prevăzute la prima și a doua liniuță sunt:

(i) pentru tuberculi de cartofi,

— utilizarea lor drept cartofi de consum destinați consumului și ambalați în locuri cu instalații corespunzătoare de eliminare a deșeurilor, pregătiți pentru livrare și folosire directă fără reambalare. Cartofii destinați însămânțării pot fi manipulați în același loc numai în cazul în care manipularea lor se face în mod separat sau după curățare și dezinfectare

sau

— utilizarea drept cartofi de consum destinați prelucrării industriale și produși pentru livrare directă și imediată către o întreprindere de prelucrare echipată cu instalații corespunzătoare de eliminare a deșeurilor, precum și cu un sistem de curățare și dezinfectare cel puțin a vehiculelor care părăsesc întreprinderea

sau

— altă utilizare sau eliminare, cu condiția să se fi stabilit că nu există nici un risc identificabil de răspândire a organismului și sub rezerva aprobării de către respectivele organisme competente oficiale;

(ii) pentru alte părți de plantă, inclusiv tulpina și resturile de frunze,

— distrugerea

sau

— altă utilizare sau eliminare, cu condiția să se fi constatat că nu există nici un risc identificabil de răspândire a organismului și sub rezerva aprobării de către respectivele organisme competente oficiale.

3. Metodele corespunzătoare de decontaminare a obiectelor prevăzute la articolul 6 alineatul (3) sunt curățarea și, după caz, dezinfecția, astfel încât să nu existe nici un risc identificabil de răspândire a organismului și sunt aplicate sub supravegherea organismelor competente oficiale ale statelor membre.

4. Seria de măsuri care urmează să fie puse în aplicare de către statele membre în cadrul zonei demarcate stabilite în conformitate cu articolul 5 alineatul (1) litera (a) punctul (iv) și litera (c) punctul (iii) și prevăzute la articolul 6 alineatul (4) include:

4.1. În cazurile în care locurile de producție au fost declarate ca fiind contaminate în conformitate cu articolul 5 alineatul (1) litera (a) punctul (ii):

(a) într-un câmp sau o unitate de producție de cultură protejată declarată ca fiind contaminată în conformitate cu articolul 5 alineatul (1) litera (a) punctul (ii),

(i) cel puțin în decursul ultimilor patru ani de cultivare următori contaminării declarate:

— sunt luate măsuri pentru eliminarea plantelor spontane de cartofi și tomate, precum și a altor plante gazdă ale organismului, inclusiv a buruienilor din familia solanacee

și

— nu se plantează următoarele:

— tuberculi, material săditor sau semințe de cartof;

— material săditor sau semințe de tomate;

— ținând seama de caracteristicile biologice ale organismului:

— alte plante gazdă;

— plante din specia *Brassica* pentru care există un risc identificat de răspândire a organismului;

— culturi pentru care există riscul identificat de răspândire a organismului;

— în primul sezon de recoltare a cartofilor sau tomatelor urmând perioadei menționate la liniuța precedentă și cu condiția ca acel câmp să fi fost declarat, în urma inspecțiilor oficiale, liber de plante spontane de cartof sau tomate și alte plante gazdă, inclusiv buruieni din familia solanacee, pentru cel puțin ultimii doi ani consecutivi de cultură anteriori plantării:

— în cazul cartofilor, se va autoriza numai producția de cartofi pentru consum;

— în cazul cartofilor și al tomatelor, tuberculii de cartof sau plantele de tomate recoltate vor fi testate, după caz, în conformitate cu procedura prevăzută în anexa II;

— în sezonul de recoltare a cartofilor sau tomatelor care urmează celui prevăzut la liniuța precedentă și urmând un ciclu de rotație corespunzător, care este de cel puțin doi ani în cazul în care trebuie cultivați cartofi de sămânță, se desfășoară o anchetă oficială prevăzută la articolul 2 alineatul (1)

sau

(ii) pe parcursul primilor cinci ani de cultivare urmând celui al contaminării declarate,

— sunt luate măsuri pentru eliminarea plantelor spontane de cartofi și tomate, precum și a altor plante gazdă ale organismului prezente în mod spontan, inclusiv a buruienilor din familia solanacee

și

— câmpul este stabilit și menținut, pe parcursul primilor trei ani, înțelenit, cultivat cu cereale în conformitate cu riscul identificat, ca pășune permanentă cu cosire la bază repetată, pășune intensivă sau cu iarbă pentru producerea de semințe, urmat de plantarea în următorii doi ani de plante care nu sunt gazde pentru organismul pentru care nu există un risc identificat de supraviețuire sau răspândire a organismului;

— în primul an de cultivare a cartofilor sau tomatelor urmând perioadei specificate la liniuța precedentă și cu condiția ca respectivul câmp să fi fost declarat liber de plante spontane de cartof și tomată și de alte plante gazdă, inclusiv buruieni din familia solanacee, pentru cel puțin ultimii doi ani consecutivi de cultură anteriori plantării:

— în cazul cartofilor, se autorizează numai producția de plante sau de cartofi destinați consumului;

— tuberculii de cartof sau plantele de tomată recoltate se testează, după caz, în conformitate cu procedura prevăzută în anexa II;

(b) pe toate celelalte câmpuri ale locului de producție contaminat și cu condiția ca organismele competente oficiale să aibă certitudinea că riscul reprezentat de plantele spontane de cartof și tomată și de alte plante gazdă ale organismului, inclusiv buruienile din familia solanacee prezente în mod spontan, a fost eliminat:

— în anul de cultivare urmând contaminării declarate:

— nu se plantează nici un tubercul, plantă, sămânță sau altă plantă gazdă a organismului;

sau

— în cazul tuberculilor de cartof, cartofii de sămânță certificați pot fi plantați numai pentru producția destinată consumului;

— în cazul tomatelor, răsadul de tomate crescut din semințe care îndeplinesc criteriile prevăzute de Directiva 2000/29/CE pentru producția exclusivă de fructe;

— în al doilea an de cultivare urmând celui în care a fost declarată contaminarea:

— în cazul cartofilor, se plantează numai cartofi de sămânță certificați sau testați oficial pentru detectarea prezenței ofilirii bacteriene și cultivați sub control oficial în alte locuri de producție decât cele prevăzute la punctul 4.1 în vederea producerii de material de înmulțire sau cartofi destinați consumului;

— în cazul tomatelor, numai răsadul de tomate crescut din semințe care îndeplinesc criteriile prevăzute de Directiva 2000/29/CE sau, în cazul înmulțirii vegetative a plantelor de tomate crescute din aceste semințe și cultivate în locuri de producție sub control oficial, altele decât cele menționate la punctul 4.1 fie pentru producția de material de înmulțire, fie pentru producția de fructe;

— pentru cel puțin al treilea an de cultivare urmând celui în care a fost declarată contaminarea,

— în cazul cartofilor, se plantează numai cartofi de sămânță certificați sau cultivați sub control oficial din cartofi de sămânță certificați pentru producția de semințe de cartof sau de cartofi destinați consumului;

— în cazul tomatelor, se plantează numai răsad de tomate crescut din semințe care îndeplinesc criteriile prevăzute de Directiva 2000/29/CE sau plante de tomate cultivate sub control oficial din acest răsad pentru producția de material de înmulțire sau fructe;

— în fiecare dintre anii de cultivare prevăzuți la liniuțele precedente, se iau măsuri pentru eliminarea plantelor spontane de cartofi și a altor plante gazdă ale organismului și se desfășoară controale oficiale ale culturii în perioade adecvate și, pe fiecare câmp de cartofi, cartofii recoltați sunt testați oficial în conformitate cu procedura prevăzută în anexa II;

(c) imediat după declararea contaminării în conformitate cu articolul 5 alineatul (1) litera (a) punctul (ii) și după primul an de cultivare care urmează:

— toate utilajele și instalațiile de depozitare de la locul de producție implicate în producerea cartofilor sau tomatelor sunt curățate și, în cazul în care este necesar, dezinfectate utilizând metode adecvate prevăzute la punctul 3;

— sunt introduse controale oficiale ale programelor de irigare sau tratare prin pulverizare, inclusiv o interzicere a acestora, în scopul prevenirii răspândirii organismului;

(d) într-o unitate de producție de cultură protejată declarată ca fiind contaminată în conformitate cu articolul 5 alineatul (1) litera (a) punctul (ii) unde este posibilă înlocuirea completă a mediului de cultură,

— nu se plantează tuberculi, răsad sau semințe de cartof sau alte plante gazdă ale organismului, inclusiv plantele și semințele de tomate, cu excepția cazului în care unitatea de producție respectivă a fost supusă măsurilor avizate oficial de eliminare a organismului și de îndepărtare a oricărui material vegetal gazdă, inclusiv, cel puțin, o schimbare completă a mediului de cultură, precum și o curățare și, după caz, dezinfectarea unității respective și a întregului echipament și în care a fost acordată ulterior aprobarea pentru producția de cartofi sau tomate din partea organismelor oficiale competente

și

— producția de cartofi provine din cartofi de sămânță certificați sau din minituberculi sau microplante provenite din surse testate;

— producția de tomate provine din semințe care îndeplinesc criteriile prevăzute de Directiva 2000/29/CE sau, în cazul înmulțirii vegetative, din răsad de tomate provenit din semințe cultivate sub control oficial;

— sunt introduse controale oficiale asupra programelor de irigare și tratare prin pulverizare, inclusiv o interzicere a acestora, în cazul în care este necesar, în scopul prevenirii răspândirii organismului.

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

(a) imediat după contaminarea declarată, iau măsuri pentru ca toate echipamentele și instalațiile de depozitare la locul de producție implicate în producția de cartofi sau de tomate să fie curățate și, în cazul în care este necesar, dezinfectate în conformitate cu metodele corespunzătoare prevăzute la punctul 3;

(b) imediat după declararea contaminării și timp de cel puțin trei ani de cultivare:

(ba) în cazurile în care zona demarcată a fost determinată în conformitate cu articolul 5 alineatul (1) litera (a) punctul (iv):

— asigură supravegherea, de către organismele lor competente oficiale, a instalațiilor de cultivare, depozitare sau de manipulare a tuberculilor de cartofi sau a tomatelor, precum și a instalațiilor care operează sub contract materialul pentru producerea cartofilor sau a tomatelor;

— solicită plantarea numai a materialului de înmulțire certificat sau a celui cultivat sub control oficial pentru toate culturile de cartofi din zona respectivă și testarea culturilor de cartofi de sămânță recoltate în locuri de producție determinate ca fiind probabil contaminate în conformitate cu articolul 5 alineatul (1) litera (a) punctul (iii);

— solicită manipularea separată a cartofilor de sămânță față de cei destinați consumului în toate întreprinderile din zona respectivă sau punerea în aplicare a unui sistem de curățare și, după caz, de dezinfecție între procedurile de manipulare a stocurilor de cartofi de sămânță și a celor destinați consumului;

— solicită plantarea plantelor de tomate provenite numai din semințe care îndeplinesc criteriile prevăzute de Directiva 2000/29/CE sau, în cazul înmulțirii vegetative, din răsad provenit din aceste semințe cultivate sub control oficial, pentru toate culturile de tomate din zona respectivă;

— desfășoară anchete oficiale în conformitate cu articolul 2 alineatul (1);

(bb) în cazurile în care apele de suprafață au fost declarate ca fiind contaminate în conformitate cu articolul 5 alineatul (1) litera (c) punctul (ii) sau incluse printre elementele de răspândire posibilă a organismului în conformitate cu anexa V punctul 2:

— desfășoară o anchetă anuală în perioade adecvate, inclusiv eșantionarea apelor de suprafață și, după caz, a plantelor gazdă corespunzătoare din familia solanacee din sursele relevante de apă, precum și teste efectuate în conformitate cu metodele prevăzute în anexa II pentru materialul vegetal enumerat și pentru celelalte cazuri;

— introduc controale oficiale asupra programelor de irigare și tratare prin pulverizare, inclusiv o interzicere a utilizării apei declarate ca fiind contaminată pentru irigarea și tratarea prin pulverizare a materialului vegetal enumerat și, după caz, a altor plante gazdă, pentru a preveni răspândirea organismului. Această interdicție poate fi revizuită în baza rezultatelor obținute în respectiva anchetă anuală, iar declarațiile de contaminare pot fi retrase atunci când autoritățile competente sunt sigure că apele de suprafață nu mai sunt contaminate. Utilizarea apei supuse interdicției poate fi autorizată sub control oficial pentru irigare sau tratare prin pulverizare în cazul în care tehnicile aplicate, autorizate oficial, elimină organismul și împiedică răspândirea acestuia;

— în cazurile în care efluenții de deșeuri lichide sunt contaminați, introduc controale oficiale asupra eliminării deșeurilor solide sau lichide din întreprinderile de prelucrare industrială sau de ambalare care se ocupă de materialul vegetal enumerat;

(c) instituie un program, după caz, de înlocuire a tuturor stocurilor de cartofi de sămânță într-o perioadă de timp corespunzătoare.

ANEXA VII

Metodele de eliminare a deșeurilor aprobate oficial, prevăzute în anexa VI alineatul (1), sunt în conformitate cu următoarele dispoziții, astfel încât să se prevină orice risc identificabil de răspândire a organismului:

(i) deșeurile din prelucrarea cartofilor și tomatelor (inclusiv cojile de cartofi, cartofii și tomatele aruncate), precum și orice alt deșeu solid asociat cu cartofii și tomatele (inclusiv solul, pietrele și alte resturi) sunt eliminate:

— într-un centru de eliminare a deșeurilor aprobat oficial unde nu există nici un risc identificabil de răspândire a organismului în mediu, de exemplu, prin infiltrare în terenurile agricole sau contact cu corpuri de apă care ar putea fi utilizate pentru irigarea terenurilor agricole. Deșeurile sunt transportate direct în locul respectiv în condiții de izolare, astfel încât să nu existe riscul pierderii deșeurilor

sau

— prin incinerare

sau

— prin orice alte măsuri, cu condiția să existe certitudinea că acestea nu prezintă nici un risc identificabil de răspândire a organismului. Aceste măsuri trebuie notificate Comisiei și celorlalte state membre;

(ii) efluenți lichizi: efluenții lichizi care conțin solide în suspensie sunt supuși unui procedeu de filtrare sau de decantare pentru extragerea acestor solide. Solidele rezultate sunt eliminate în conformitate cu cele prevăzute la punctul (i).

Efluenții lichizi sunt ulterior:

— bine încălziți la o temperatură de 60 °C timp de cel puțin 30 de minute înainte de eliminare

sau

— eliminați în alt mod, sub rezerva aprobării oficiale și sub control oficial, astfel încât să nu existe nici un risc identificabil ca deșeurile să intre în contact cu terenurile agricole sau cu corpuri de apă care ar putea fi folosite pentru irigarea terenurilor agricole. Detaliile cu privire la aceasta sunt notificate celorlalte state membre și Comisiei.

Ansamblul procedurilor descrise în prezenta anexă se aplică și deșeurilor legate de manipularea, eliminarea și tratarea loturilor contaminate.”