

lació fiscal espanyola respecte dels procediments fiscals de l'Administració Tributària.

Per donar fe de tot això, els signataris, degudament autoritzats a l'efecte, han signat i segellat el present Protocol.

Fet en doble exemplar a Madrid, el 29 de juny de 2006, en les llengües espanyola, francesa i anglesa; tots els textos són igualment autèntics. En cas de divergència en la interpretació, aquesta s'ha de resoldre d'acord amb el text en llengua anglesa.»

| | |
|---|-----------------------------------|
| Pel Govern del Regne d'Espanya, | Pel Consell Federal Suís, |
| <i>Carlos Ocaña y Pérez de Tudela</i> | <i>Armin Ritz</i> |
| Secretari d'Estat d'Hisenda i Pressupostos | Ambaixador de Suïssa a Espanya |

Article 7.

1. Els governs dels estats contractants s'han de notificar entre si, per via diplomàtica, el compliment dels procediments interns que preveu la seva legislació per a l'entrada en vigor del present Protocol de modificació.

2. El Protocol de modificació entra en vigor tres mesos després de la data de la recepció de l'última de les notificacions a les quals es refereix l'apartat 1 i les seves disposicions tenen efecte:

a) En el cas d'impostos de meritació periòdica, respecte dels impostos sobre la renda o sobre el patrimoni corresponents a qualsevol exercici fiscal que comenci a partir de la data en què el Protocol de modificació entri en vigor;

b) En relació amb els restants impostos, en la data en què el Protocol de modificació entri en vigor.

3. No obstant el que disposa l'apartat 2, el present Protocol de modificació no té efecte:

(i) en relació amb els articles 1 i 2 del present Protocol de modificació, abans de la data d'aplicació de l'Acord entre la Comunitat i la Confederació Suïssa relatiu a l'establiment de mesures equivalents a les que preveu la Directiva 2003/48/CE del Consell en matèria de fiscalitat dels rendiments de l'estalvi en forma de pagament d'interessos;

(ii) en relació amb l'article 3 del present Protocol de modificació, abans de l'endemà de l'expiració del període transitori de sis anys que comença en la data d'inici de l'aplicació de l'Acord esmentat en el subapartat (i) anterior.

4. L'intercanvi d'informació és efectiu per als casos de frau fiscal o infracció equivalent en què s'incurri després de la data de la signatura del present Protocol de modificació.

Per donar fe de tot això, els signataris, degudament autoritzats a l'efecte, han signat i segellat el present Protocol de modificació.

Fet en doble exemplar a Madrid, el 29 de juny de 2006, en les llengües espanyola, francesa i anglesa; tots els textos són igualment autèntics. En cas de divergència en la interpretació, aquesta s'ha de resoldre d'acord amb el text en llengua anglesa.

| | |
|---|--------------------------------|
| Pel Govern del Regne d'Espanya, | Pel Consell Federal Suís, |
| <i>Carlos Ocaña y Pérez de Tudela</i> | <i>Armin Ritz</i> |
| Secretari d'Estat d'Hisenda i Pressupostos | Ambaixador de Suïssa a Espanya |

El present Protocol entra en vigor l'1 de juny de 2007, tres mesos després de la data de recepció de

l'última notificació encreuada entre les parts per via diplomàtica, de compliment dels procediments interns que preveuen les seves respectives legislacions, d'acord amb el que estableix l'article 7.2.

Es fa públic per a coneixement general.

Madrid, 9 de març de 2007.—El secretari general tècnic del Ministeri d'Afers Exteriors i de Cooperació, Francisco Fernández Fábregas.

6420 *CORRECCIÓ d'errors de les Esmenes de 2004 a l'Annex del Protocol de 1978, relatiu al Conveni internacional per prevenir la contaminació pels vaixells, 1973 (Annex I revisat del MARPOL 73/78) (publicat en el «Butlletí Oficial de l'Estat» de 17 i 18 d'octubre de 1984), aprovades el 15 d'octubre de 2004 mitjançant la Resolució MEPC 117(52). («BOE» 74, de 27-3-2007.)*

Per notificació del secretari general de l'Organització Marítima Internacional de data 5 de febrer de 2007 es comunica que s'ha detectat un error en l'entrada en vigor de les Esmenes de 2004 a l'Annex del Protocol de 1978, relatiu al Conveni internacional per prevenir la contaminació pels vaixells, 1973 (Annex I revisat del MARPOL 73/78) (publicat en el «Butlletí Oficial de l'Estat» de 17 i 18 d'octubre de 1984), aprovades el 15 d'octubre de 2004 mitjançant la Resolució MEPC 117(52), publicades en el «Butlletí Oficial de l'Estat» núm. 38, de 13.2.2007, i en el suplement en català núm. 6, de 16 de febrer de 2007.

A continuació se'n transcriu la rectificació oportuna:

Les presents Esmenes van entrar en vigor de manera general i per a Espanya l'1 de gener de 2007 de conformitat amb el que estableix l'article 16 2) g) ii), excepte per als Estats Units, Finlàndia i Austràlia de conformitat amb l'article 16 2) f) iii) del Conveni de 1973.

Es fa públic per a coneixement general.

Madrid, 1 de març de 2007.—El secretari general tècnic del Ministeri d'Afers Exteriors i de Cooperació, Francisco Fernández Fábregas.

MINISTERI D'AGRICULTURA, PESCA I ALIMENTACIÓ

6421 *ORDRE APA/718/2007, de 15 de març, per la qual es modifiquen els annexos de l'Ordre de 22 de març de 1994, relativa a la lluita contra la necrosi bacteriana de la patata, en aplicació de la Directiva 93/85/CEE del Consell de les Comunitats Europees. («BOE» 74, de 27-3-2007.)*

L'organisme nociu, *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis *et al.* ssp. *sepedonicus* és la causa de la malaltia denominada necrosi bacteriana de la patata i representa una greu amenaça per a les produccions d'aquests tubercles.

La Directiva 93/85/CEE del Consell, de 4 d'octubre de 1993, relativa a la lluita contra la necrosi bacteriana de la patata, estableix les mesures detallades que s'han

d'adoptar en el si de la Comunitat per a la lluita contra aquest organisme nociu, i es va incorporar a l'ordenament jurídic espanyol per l'Ordre de 22 de març de 1994, relativa a la lluita contra la necrosi bacteriana de la patata, en aplicació de la Directiva 93/85/CEE del Consell de les Comunitats Europees. Aquestes mesures tenen com a finalitat localitzar l'organisme i determinar-ne la distribució, impedir-ne l'aparició i, en cas que l'aparició tingui lloc, evitar que es propagui i combatre'l amb la finalitat d'eradicar-lo.

Tenint en compte que els últims anys el coneixement d'aquesta malaltia i els seus mètodes de detecció i identificació han avançat considerablement i que l'experiència adquirida en el seguiment i la lluita contra aquest organisme aconsellen revisar determinades disposicions tècniques relacionades amb les mesures de control, s'han modificat els annexos de la dita Directiva mitjançant la Directiva 2006/56/CE de la Comissió, de 12 de juny de 2006, per la qual es modifiquen els annexos de la Directiva 93/85/CEE del Consell, relativa a la lluita contra la necrosi bacteriana de la patata.

En conseqüència, mitjançant aquesta Ordre s'incorpora a l'ordenament intern la Directiva 2006/56/CE de la Comissió, de 12 de juny de 2006.

En l'elaboració de la present disposició han estat consultades les comunitats autònomes i les entitats representatives dels sectors afectats.

En virtut d'això, disposo:

Article únic. *Modificació dels annexos de l'Ordre de 22 de març de 1994, relativa a la lluita contra la necrosi bacteriana de la patata, en aplicació de la Directiva 93/85/CEE del Consell de les Comunitats Europees.*

Els annexos de l'Ordre de 22 de març de 1994, relativa a la lluita contra la necrosi bacteriana de la patata, en aplicació de la Directiva 93/85/CEE del Consell de les Comunitats Europees, se substitueixen pels que figuren com a annex de la present Ordre.

Disposició final primera. *Títol competencial.*

La present Ordre es dicta a l'empara de l'article 149.1.13a de la Constitució, que atribueix a l'Estat la competència exclusiva sobre les bases i coordinació de la planificació general de l'activitat econòmica.

Disposició final segona. *Entrada en vigor.*

La present Ordre entra en vigor el dia 1 d'abril de 2007.

Madrid, 15 de març de 2007.—La ministra d'Agricultura, Pesca i Alimentació, Elena Espinosa Mangana.

ANNEX

Modificació dels annexos de l'Ordre de 22 de març de 1994, relativa a la lluita contra la necrosi bacteriana de la patata, en aplicació de la Directiva 93/85/CEE del Consell de les Comunitats Europees

«ANNEX I

Mètode de diagnòstic, detecció i identificació de la necrosi bacteriana, *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff).

ÀMBIT D'APLICACIÓ DEL MÈTODE

El mètode exposat descriu diversos procediments relacionats amb:

- i) el diagnòstic de la necrosi bacteriana en tubercles i plantes de patata,
- ii) la detecció de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* en mostres de tubercles i plantes de patata,
- iii) la identificació de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*C. m.* subsp. *sepedonicus*).

PRINCIPIS GENERALS

Els apèndixs recullen protocols optimitzats per als diferents mètodes, reactius validats i dades relatives a la preparació dels materials utilitzats en les proves i dels materials de control. L'apèndix 1 inclou una llista dels laboratoris que van participar en l'optimització i la validació dels protocols.

Atès que els protocols comporten la detecció d'un organisme subjecte a quarantena i inclouen la utilització de cultius viables de *C. m.* subsp. *sepedonicus* com a materials de control, és necessari executar els procediments en les condicions de quarantena apropiades amb les instal·lacions necessàries per eliminar els residus i tenint els permisos pertinents emesos per les autoritats oficials responsables de la quarantena fitosanitària.

Els paràmetres de prova han de garantir la detecció coherent i reproducible dels nivells de *C. m.* subsp. *sepedonicus* en els límits fixats pels mètodes seleccionats.

És essencial una preparació precisa dels controls positius.

El fet d'executar les proves d'acord amb els límits exigits també implica la utilització dels ajustos correctes, el manteniment i el calibratge de l'equip, una cura manipulació i conservació dels reactius, i l'aplicació de totes les mesures destinades a evitar la contaminació entre les mostres, com, per exemple, la separació dels controls positius de les mostres de prova. S'han d'aplicar normes relatives al control de la qualitat amb la finalitat d'evitar errors administratius i d'un altre tipus, especialment pel que fa a l'etiquetatge i la documentació.

Qualsevol aparició sospitosa, com la que figura a l'article 4, apartat 2, d'aquesta Ordre, comporta un resultat positiu en les proves de diagnòstic o de selecció realitzades amb una mostra d'acord amb el que especifiquen els diagrames de flux.

Si en la primera prova de selecció (IF o PCR/FISH) s'obté un resultat positiu, es pot sospitar la contaminació amb *C. m.* subsp. *sepedonicus* i s'ha d'efectuar una segona prova de selecció. Si el resultat de la segona prova de selecció és positiu, la sospita es confirma (aparició sospitosa) i les proves han de prosseguir d'acord amb el mètode. En cas que el resultat de la segona prova de selecció sigui negatiu, la mostra no s'ha de considerar contaminada amb *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

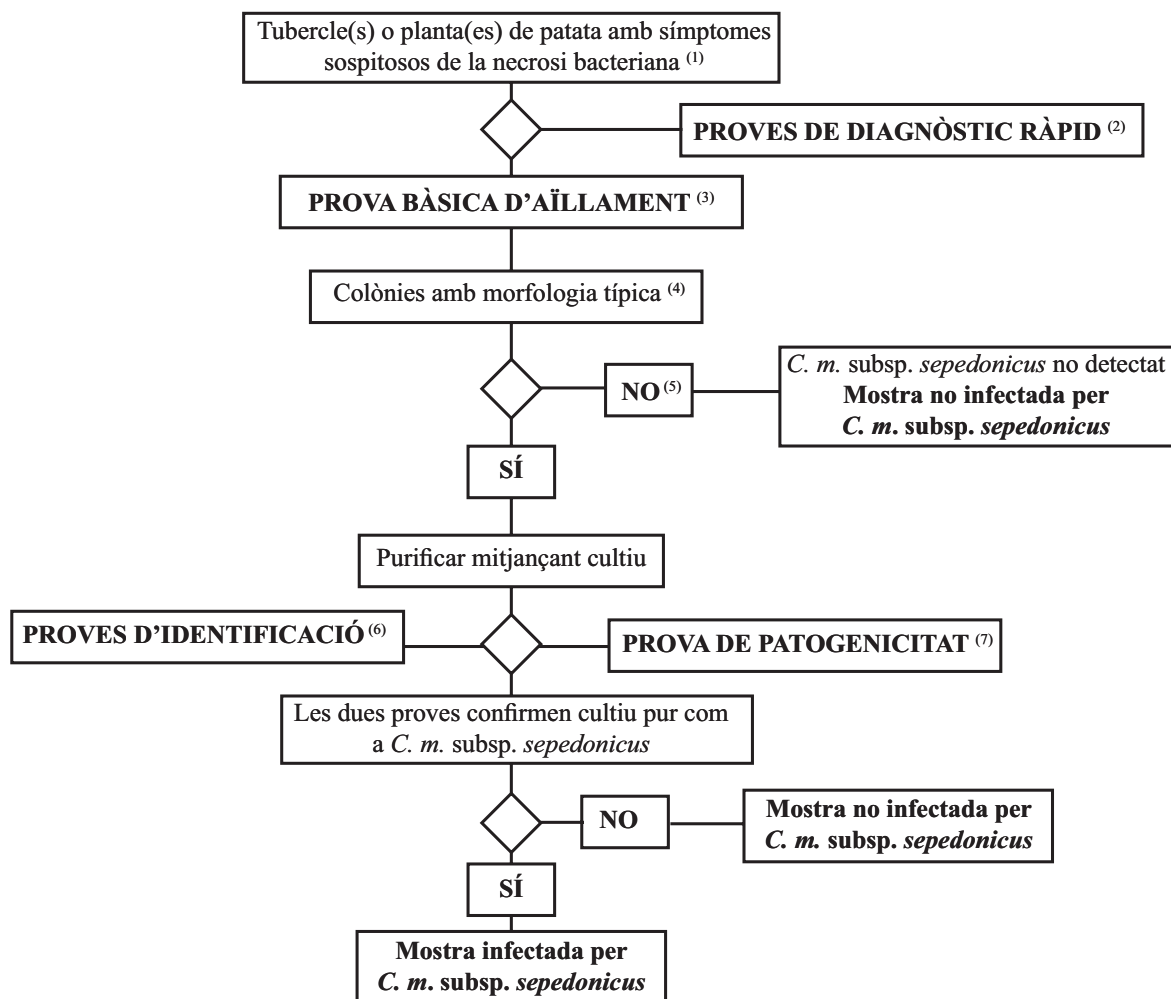
Per tant, els resultats positius d'una prova IF a què fa referència l'article 4, apartat 2, es defineixen mitjançant una lectura positiva en una prova IF confirmada per una segona prova de selecció (PCR/FISH).

La presència confirmada a què fa referència l'article 5, apartat 1, d'aquesta Ordre, requereix l'aïllament i la identificació d'un cultiu pur de *C. m.* subsp. *sepedonicus* amb confirmació de la seva patogenicitat.

1. PRESENTACIÓ EN DIAGRAMES DE FLUX

1.1. Mètode de detecció per al diagnòstic de la necrosi bacteriana en tubercles i plantes de patata que presenten símptomes de necrosi bacteriana

Aquest protocol d'anàlisi està destinat als tubercles i plantes de patata que mostren símptomes típics o sospitosos de necrosi bacteriana. Inclou una prova de selecció ràpida, l'aïllament del patogen del teixit vascular infectat en un medi de diagnòstic i, en cas de resultat positiu, la identificació del cultiu com a *C. m. subsp. sepedonicus*.



(1) El punt 2 recull una descripció dels símptomes.

(2) Es consideren adequades les proves següents:

- la prova IF (punt 4),
- la prova PCR (punt 5),
- la prova FISH (punt 6).

(3) Encara que l'aïllament de patogen a partir de material vegetal amb símptomes típics mitjançant dilució de plaques és senzill, l'aïllament pot fallar en estats avançats d'infecció, els bacteris sapròfits que creixen en el teixit malalt poden emascarar o inhibir el patogen en el medi d'aïllament. Per tant, es recomana utilitzar medis selectius i no selectius, preferiblement MTNA (punt 8) o la prova de bioassaig (punt 7).

(4) El punt 8 recull una descripció de la morfologia típica de les colònies.

(5) Si els resultats de la prova d'aïllament són negatius, però els símptomes de la malaltia són els típics, l'aïllament s'ha de repetir.

(6) La identificació fiable d'un cultiu pur de *C. m. subsp. sepedonicus* s'aconsegueix utilitzant les proves que s'enumeren en el punt 9.

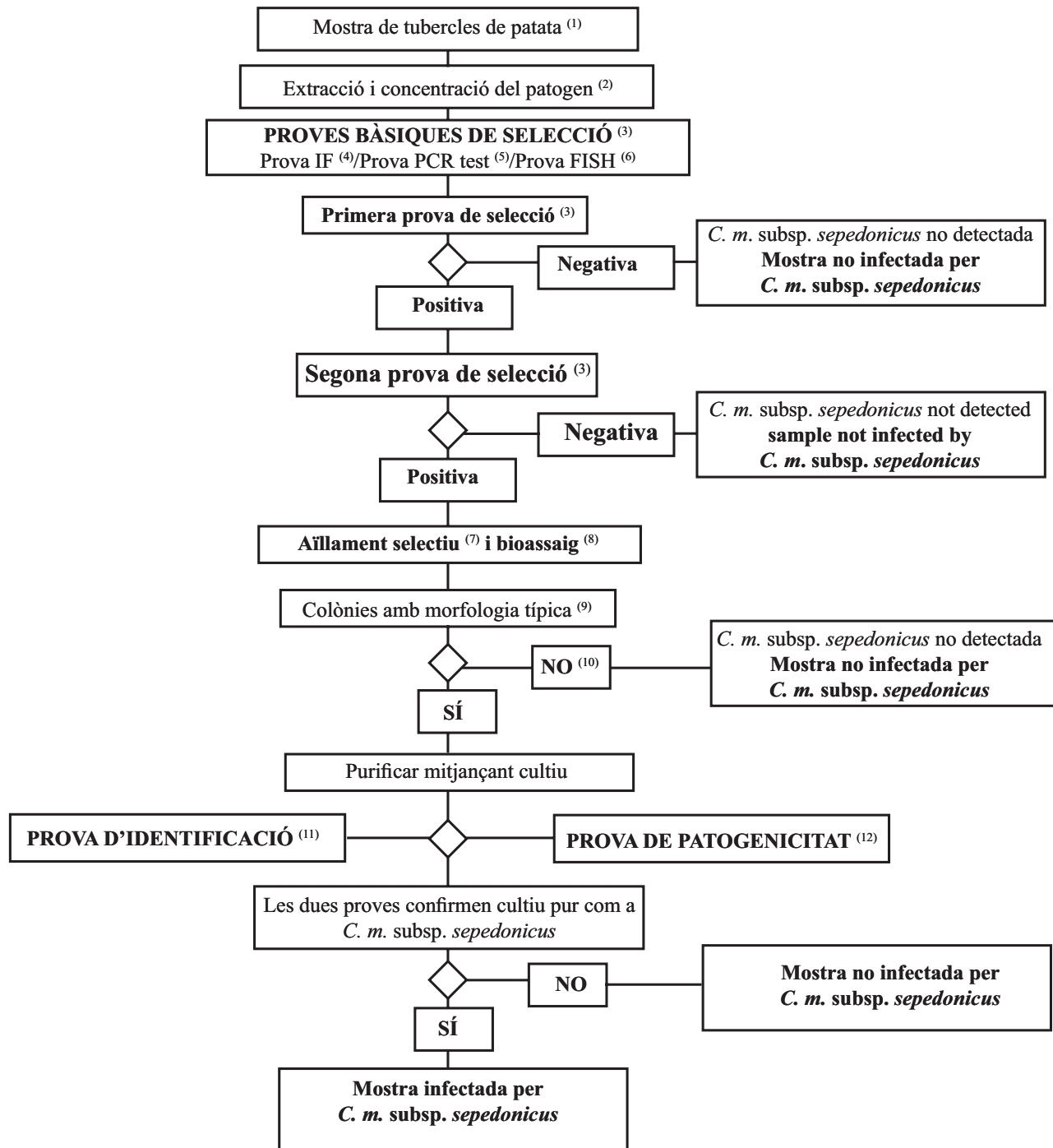
(7) En el punt 10 es descriu la prova de patogenicitat.

1.2. Mètode de detecció i identificació de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* en mostres de tubercles de patata asimptomàtics.

Principi

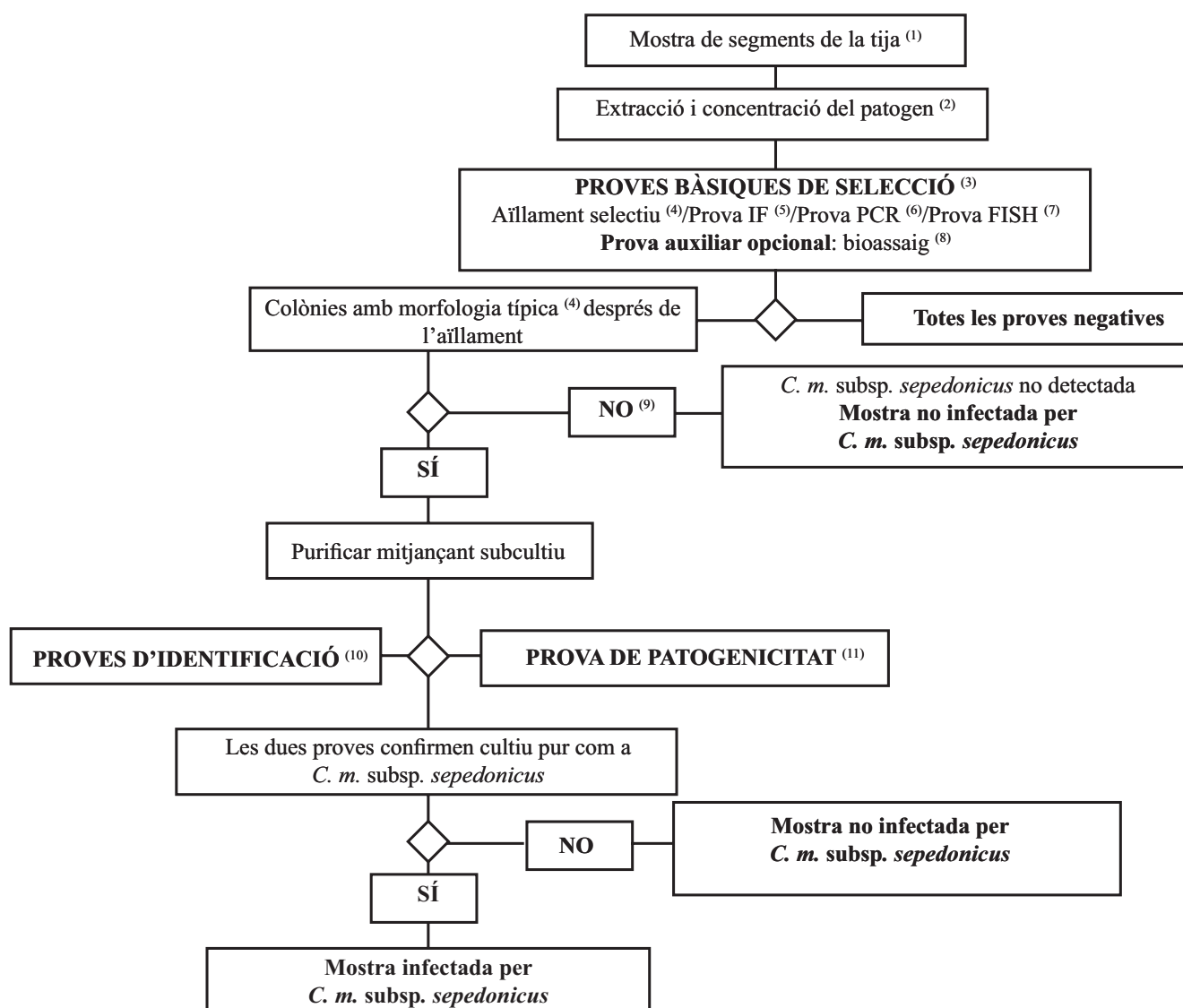
Aquest protocol d'anàlisi es destina a detectar infeccions latents en tubercles de patata asimptomàtics mitjançant almenys dues proves de selecció basades en diferents principis biològics que, si són positives, s'han de complementar amb l'aïllament del patogen; en cas d'aïllament de colònies típiques, a continuació s'ha de procedir a fer la identificació d'un cultiu pur com a *C. m. subsp. sepedonicus*. El fet d'obtenir resultats positius només en una de les proves no és suficient per considerar sospitosa la mostra.

Les proves de selecció i aïllament han de permetre límits de detecció de 10^3 a 10^4 cèl·lules per ml de precipitat resuspès, inclosos com a controls positius en cada sèrie de proves.



- (1) La mida normal de la mostra és de 200 tubercles, encara que el procediment es pot adaptar per a mostres amb menys tubercles en cas que no es disposi de 200.
- (2) Els mètodes d'extracció i concentració del patogen es descriuen en el punt 3.1.
- (3) En cas que almenys dues de les proves basades en principis biològics diferents proporcionin resultats positius, s'ha de procedir a fer-ne l'aïllament i la confirmació. S'ha de realitzar com a mínim una prova de selecció. Quan el resultat d'aquesta prova sigui negatiu, la mostra s'ha de considerar negativa. En cas que el resultat d'aquesta prova sigui positiu, és necessari realitzar dues proves de selecció o més basades en principis biològics diferents amb la finalitat de verificar el primer resultat positiu. Si la segona prova o la resta de les proves proporcionen resultats negatius, la mostra s'ha de considerar negativa i no és necessari portar a terme més proves.
- (4) Prova d'immunofluorescència (IF). Per a la prova de selecció IF sempre s'ha d'utilitzar un anticòs policlonal; els anticossos monoclonals addicionals poden proporcionar més especificitat (vegeu el punt 4).
- (5) Prova PCR. S'han d'utilitzar reactius i protocols PCR convenientment validats (vegeu el punt 6).
- (6) Prova FISH. S'han d'utilitzar reactius i protocols convenientment validats (vegeu el punt 5).
- (7) Aïllament selectiu. Amb el medi MTNA o el medi NCP-88 i una dilució a l'1/100 del precipitat resuspès, en molts casos és un mètode adequat per a l'aïllament directe de *C. m. subsp. sepedonicus*. Entre 3 i 10 dies després de la sembra selectiva es poden obtenir colònies típiques. Posteriorment es pot purificar i identificar el patogen. Per poder aprofitar plenament el potencial de la prova, és necessari preparar amb cura les falques de la part basal a fi d'evitar que uns altres bacteris secundaris associats al tubercle de la patata, que competeixin amb *C. m. subsp. sepedonicus* en el medi, puguin afectar el desenvolupament del patogen. Si la prova de la sembra selectiva no resulta efectiva, s'ha de procedir a fer-ne l'aïllament a partir de les plantes utilitzades per al bioassaig (vegeu el punt 8).
- (8) La prova de bioassaig s'utilitza per a l'aïllament de *C. m. subsp. sepedonicus* a partir de precipitat d'extracte de patates mitjançant l'enriquiment selectiu del bacteri en albergínies (*Solanum melongena*). Exigeix que les condicions d'incubació siguin òptimes, segons s'especifiquen en aquest mètode. És molt probable que els bacteris inhibidors de *C. m. subsp. sepedonicus* en els medis MTNA o NCP-88 no interfereixin en aquesta prova (vegeu el punt 7).
- (9) En el punt 8 es descriu la morfologia típica de les colònies.
- (10) Els cultius o bioassajos poden fallar a causa de la competència dels bacteris sapròfits o de la inhibició provocada per aquests. En cas que s'obtinguin resultats positius en les proves de selecció però negatius en les d'aïllament, s'han de repetir les proves d'aïllament a partir del mateix precipitat o utilitzant a més teixit vascular de la part basal de tubercles tallats de la mateixa mostra i, si és necessari, amb altres mostres.
- (11) La identificació fiable de cultius purs suposadament de *C. m. subsp. sepedonicus* s'aconsegueix utilitzant les proves que descriu el punt 9.
- (12) En el punt 10 es descriu la prova de patogenicitat.

1.3. Mètode de detecció i identificació de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* en mostres de plantes de patata asimptomàtiques



(1) Vegeu el punt 3.2 per obtenir informació sobre les mides recomanades de la mostra.

(2) Els mètodes d'extracció i concentració del patogen es descriuen en el punt 3.2.

(3) En cas que almenys dues de les proves basades en principis biològics diferents proporcionin resultats positius, s'ha de procedir a fer-ne l'aïllament i la confirmació. S'ha de realitzar com a mínim una prova de selecció. Quan el resultat de la prova sigui negatiu, la mostra s'ha de considerar negativa. En cas que el resultat d'aquesta prova sigui positiu, és necessari realitzar dues proves de selecció o més basades en principis biològics diferents amb la finalitat de verificar el primer resultat positiu. Si la segona prova o la resta de les proves proporcionen resultats negatius, la mostra s'ha de considerar negativa i no és necessari portar a terme més proves.

(4) En el punt 8 es descriu la prova d'aïllament selectiu i la morfologia típica de les colònies.

(5) En el punt 4 es descriu la prova IF.

(6) En el punt 6 es descriu la prova PCR.

(7) En el punt 5 es descriu la prova FISH.

(8) En el punt 7 es descriu la prova de bioassaig.

(9) Els cultius o bioassajos poden fallar a causa de la competència dels bacteris sapròfits o de la inhibició provocada per aquests. En cas que s'obtinguin resultats positius en les proves de selecció però negatius en les d'aïllament, s'han de repetir les proves d'aïllament i, si és necessari, efectuar proves amb altres mostres.

(10) La identificació fiable de cultius purs suposadament de *C. m. subsp. sepedonicus* s'aconsegueix utilitzant les proves que es descriuen en el punt 9.

(11) En el punt 10 es descriu la prova de patogenicitat.

2. EXAMEN VISUAL PER DETECTAR SÍMPTOMES DE NECROSI BACTERIANA

2.1. Plantes de patata

En les condicions climàtiques europees, els símptomes es presenten rares vegades en el camp i amb freqüència només al final de la temporada. D'altra banda, en nombrosos casos, altres malalties, la senescència o els danys mecànics emmascaren els símptomes o es confonen amb els símptomes. Per tant, pot ser fàcil passar per alt els símptomes en les inspeccions de camp. Els símptomes de marcimient són molt diferents dels de la podridura marró; el marcimient és normalment un procés lent i es limita en principi a les vores de les fulles. El creixement de les fulles joves infectades no se sol aturar, encara que sigui més lent en les zones infectades. Això fa que les fulles tinguin formes estranyes. Les fulles afectades pel bloqueig dels teixits vasculars de la part baixa de la tija desenvolupen amb freqüència zones internervioses cloròtiques grogues o ataronjades. Els folíols, les fulles i fins i tot les tiges infectats poden arribar a morir. Amb freqüència les fulles i tubercles mostren simplement una mida reduïda. En alguns casos les plantes s'atrofien. Es poden consultar fotografies en color d'alguns d'aquests símptomes en el lloc web: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

2.2. Tubercles de patata

Els primers símptomes consisteixen en un lleuger aspecte vitri o translúcid del teixit, sense estovament, al voltant del sistema vascular, en especial a prop de la part basal. La corona vascular de la part basal pot tenir un color lleugerament més fosc del normal. El primer símptoma clarament detectable consisteix en el fet que la corona vascular adquireix una coloració groguenca i quan es comprimeix suaument el tubercle surt dels vasos un exsudat d'aspecte lletós. Aquest exsudat conté milions de bacteris. Es pot produir l'enfosquiment del teixit vascular i els símptomes que presenten els tubercles en aquesta fase són similars als de la podridura marró provocada per *Ralstonia solanacearum*. Al principi, aquests símptomes es poden limitar a una part de la corona, no necessàriament a prop de la part basal, i després es poden estendre a la totalitat de la corona.

A mesura que la infecció progressa, es produeix una destrucció de teixit vascular; la zona cortical externa es pot separar de la zona cortical interna. En les fases avançades de la infecció, es produeixen esquerdes en la superfície del tubercle, que solen tenir un color marró rogenc en les vores. Recentment se n'han produït diversos casos a Europa en què la zona cortical central s'ha podrit alhora que la corona vascular provocant una invasió secundària amb cavitats i necrosi interna. Els símptomes es poden emmascarar per una invasió secundària fúngica o bacteriana que pot dificultar, o fins i tot fer impossible, diferenciar els símptomes de necrosi bacteriana avançada d'altres necrosis dels tubercles. Es poden presentar símptomes atípics. Es poden consultar fotografies en color d'alguns d'aquests símptomes en el

lloc web:

<http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

3. PREPARACIÓ DE LA MOSTRA

3.1. Tubercles de patata

Nota:

— La mida normal de la mostra és de 200 tubercles per assaig. Per realitzar un mostratge més intensiu cal portar a terme més proves amb mostres d'aquesta mida. El fet de disposar d'un nombre més gran de tubercles en la mostra pot provocar la inhibició o dificultar la interpretació dels resultats. No obstant això, el procediment es pot adaptar convenientment a mostres formades per un nombre més petit de tubercles en cas que no es disposi de 200.

— La validació de tots els mètodes de detecció descrits més endavant es basa en els assajos realitzats amb mostres de 200 tubercles.

— L'extracte de patata descrit a continuació també es pot fer servir per detectar el bacteri de la podridura marró de la patata, *Ralstonia solanacearum*.

Pretractament opcional previ a la preparació de la mostra:

Rentar els tubercles. S'han de fer servir desinfectants (quan s'hagi d'efectuar la prova PCR, la desinfecció amb compostos de clor pot interferir en l'extracció d'ADN del patogen) i detergents adequats per a cada mostra. Assecar els tubercles a l'aire. Aquest procediment de rentatge és particularment útil (encara que no necessari) en el cas de mostres amb excés de terra i quan s'hagi d'efectuar una prova PCR o un procediment d'aïllament directe.

3.1.1. S'ha de treure l'epidermis de la part basal de cada tubercle amb un bisturí o un ganivet net i desinfectat, de manera que el teixit vascular quedi a la vista. Extreure acuradament una petita falca de teixit vascular de la part basal i el mínim volum possible de teixit no vascular (vegeu el lloc web:

<http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Nota: cal retirar els tubercles que presentin símptomes sospitosos de necrosi bacteriana i analitzar-los separatament.

En cas que s'observin símptomes sospitosos de necrosi bacteriana durant l'extracció de la falca de la part basal, s'ha de realitzar una inspecció visual del tubercle una vegada tallat a l'altura de la part basal.

Qualsevol tubercle tallat que presenti símptomes sospitosos s'ha de suberitzar a temperatura ambient durant dos dies i s'ha d'emmagatzemar en quarantena (a una temperatura d'entre 4 i 10°C) fins que concloguin tots els assajos. Totes les mostres de tubercles, incloses les que presentin símptomes sospitosos, s'han de conservar d'acord amb el que disposa l'annex II.

3.1.2. Introduir les falques de la part basal en recipients no retornables que no s'hagin utilitzat prèviament i que es puguin tancar i/o segellar (en cas que aquests recipients s'hagin de tornar a utilitzar s'han de netejar i desinfectar

a consciència amb compostos de clor). Preferiblement, les falques s'han de processar immediatament. Si no és possible, s'han d'emmagatzemar en el recipient, sense tampó, i conservar-se per un període màxim de 72 hores refrigerades o de 24 hores a temperatura ambient. L'assecatge i la suberització de les falques, així com el creixement de sapròfits durant l'emmagatzematge, poden dificultar la detecció del bacteri causant de la necrosi bacteriana.

3.1.3. Processar les falques basals per un dels mètodes següents:

a) o bé afegir la solució de tampó d'extracció (apèndix 3) en quantitat suficient perquè cobreixi les falques (aproximadament 40 ml) i agitar en un agitador rotatori (50-100 rpm) durant 4 hores a una temperatura inferior a 24°C o durant 16 a 24 hores si estan refrigerades;

b) o bé homogeneïtzar les falques amb solució de tampó d'extracció (apèndix 3) en quantitat suficient (aproximadament 40 ml), ja sigui mitjançant una trituradora (per exemple, Waring o Ultra Thurax) o triturar-les en una bossa de maceració no reutilitzable segellada (per exemple, bosses resistents Stomacher o Bioreba de polietilè de 150 mm × 250 mm, esterilitzades per radiació) utilitzant un mall de cautxú o un aparell triturador adequat (per exemple, Homex).

Nota: el risc de contaminació encreuada de les mostres és alt quan s'homogeneïtzen mitjançant una trituradora. S'ha d'actuar amb precaució per evitar la generació d'aerosols o l'abocament durant el procés d'extracció. Cal assegurar-se que s'esterilitzen les ganivetes de la trituradora i els recipients que s'hagin d'utilitzar per a cada mostra. Si s'ha de realitzar la prova PCR, és necessari evitar que hi hagi restes d'ADN en els recipients o l'aparell triturador. Quan s'hagi d'efectuar la prova PCR es recomana fer la trituració en bosses no reutilitzables i fer servir tubs d'un sol ús.

3.1.4. Decantar el sobrenedant. Si presenta un aspecte excessivament tèrbol, s'ha de clarificar centrifugant-lo a baixa velocitat (a 180 g com a màxim, durant 10 minuts, a una temperatura entre 4 i 10°C) o mitjançant filtració al buit (40-100 µm), rentant el filtre amb solució addicional (10 ml) de tampó d'extracció (apèndix 3).

3.1.5. Concentrar la fracció bacteriana mitjançant centrifugació a 7.000 g durant 15 minuts (o a 10.000 g durant 10 minuts) a una temperatura entre 4 i 10°C i descartar el sobrenedant sense pertorbar el precipitat.

3.1.6. Resuspendre el precipitat en 1,5 ml de tampó de precipitat (apèndix 3). Utilitzar 500 µl per a la prova de *C. m. subsp. sepedonicus*, 500 µl per a *Ralstonia solanacearum* i 500 µl als efectes de referència. Afegir glicerol estèril en una concentració final de 10-25% (v/v) als 500 µl de l'aliquota de referència i en l'aliquota restant de cada prova, homogeneïtzar per agitació i guardar a una temperatura entre -16 i -24°C (setmanes) o entre -68 i -86°C (mesos). Mantenir les alíquotes de la prova a una temperatura compresa entre 4 i 10°C durant els assajos.

No és recomanable congelar i descongelar l'extracte en repetides ocasions.

Si cal transportar l'extracte, és convenient assegurar-se que se n'efectua el lliurament en una caixa refrigerada en el termini de 24 a 48 hores.

3.1.7 És imprescindible que tots els controls i les mostres positives de *C. m. subsp. sepedonicus* es processin per separat, a fi d'evitar la contaminació. Això s'aplica a les preparacions per a IF i a totes les proves.

3.2. Plantes de patata

Nota: per detectar poblacions latents de *C. m. subsp. sepedonicus* es recomana efectuar les proves amb mostres mixtes. El procediment es pot adaptar convenientment per a mostres mixtes de fins a 200 parts de tiges (els estudis s'han de basar en una mostra representativa des del punt de vista estadístic de la població vegetal que se sotmeti a investigació).

3.2.1. Extreure una secció d'1 a 2 cm de la base de cada tija, justament per damunt del nivell del terra, utilitzant un ganivet o tisores de podar nets i desinfectats.

Desinfectar lleugerament les seccions de tija amb etanol al 70% i eixugar immediatament amb un mocador de paper.

Introduir les seccions de tija en un recipient estèril tancat d'acord amb els procediments de mostratge següents:

3.2.2. Processar les seccions de tija mitjançant un dels mètodes següents:

a) o bé afegir la solució de tampó d'extracció (apèndix 3) en quantitat suficient perquè cobreixi les seccions (aproximadament 40 ml) i agitar en un agitador rotatori (50-100 rpm) durant 4 hores a una temperatura inferior a 24°C o durant 16 a 24 hores si estan refrigerades;

b) o bé processar immediatament triturant les seccions en una bossa de maceració resistent (per exemple, Stomacher o Bioreba) amb una quantitat adequada de tampó d'extracció (apèndix 3) utilitzant per a això un mall de cautxú o un aparell triturador adequat (per exemple, Homex). Si no és possible, emmagatzemar les seccions de tija refrigerades durant 72 hores com a màxim o a temperatura ambient durant 24 hores com a màxim.

3.2.3. Decantar el sobrenedant després d'haver-lo deixat reposar durant 15 minuts.

3.2.4. Normalment no és necessari clarificar més l'extracte ni la concentració de la fracció bacteriana, però això es pot aconseguir mitjançant la filtració i/o la centrifugació, tal com es descriu en els punts 3.1.4 a 3.1.6.

3.2.5. Dividir l'extracte pur o concentrat de la mostra en dues parts iguals. Mantenir una de les parts a 4-10°C durant els assajos i emmagatzemar la part restant, després d'haver-hi afegit glicerol estèril al 10-25% (v/v), a una temperatura compresa entre -16 i -24°C (setmanes) o entre -68 i -86°C (mesos), en cas que sigui necessari realitzar noves proves.

4. PROVA IF

Principi:

La utilització de la prova IF com a principal prova de selecció està recomanada per la seva solidesa demostrada per assolir els límits exigits.

Quan s'utilitzi la prova IF com a principal prova de selecció i la prova proporcioni resultats positius, s'han de realitzar les proves PCR o FISH com a segona prova de selecció. Quan s'utilitzi la prova IF com a segona prova de selecció i la prova proporcioni resultats positius, és necessari realitzar les proves establertes en el diagrama de flux per completar l'anàlisi.

Nota: quan s'utilitzi la prova IF com a principal prova de selecció, sempre s'ha d'utilitzar un anticòs policlonal. En el cas de resultats IF positius amb un anticòs policlonal, la selecció posterior de la mostra amb un anticòs monoclonal pot proporcionar més especificitat però pot ser menys sensible.

Convé utilitzar anticossos enfront de la soca de referència de *C. m. subsp. sepedonicus*. Es recomana determinar el títol per a cada nou lot d'anticossos. El títol es defineix com la dilució superior en què es produeix la reacció òptima quan es realitza la prova amb una suspensió que conté entre 10^5 i 10^6 cèl·lules per ml de la soca homòloga de *C. m. subsp. sepedonicus* i s'utilitza una dilució apropiada del conjugat d'isotiocianat de fluoresceïna (FITC), segons les recomanacions del fabricant.

Els anticossos policlonals o monoclonals crus haurien de tenir un títol IF d'almenys 1:2000. Durant les proves, els anticossos s'haurien d'utilitzar en dilucions de treball (DT) pròximes o iguals al títol. Utilitzar anticossos validats.

(Vegeu el lloc web:

<http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

La prova s'hauria de realitzar amb extractes de mostres que s'acabin de preparar. Si és necessari, també es pot efectuar amb extractes emmagatzemats a una temperatura compresa entre -68 i -86°C en glicerol. El glicerol es pot separar de la mostra mitjançant l'addició d'1 ml de tampó de precipitat (apèndix 4), la recentrifugació durant 15 minuts a 7.000 g i la resuspensió en el mateix volum de tampó de precipitat. Normalment això no és necessari, especialment si les mostres es fixen al portaobjectes flamejant-les (vegeu el punt 2.2).

Preparar altres portaobjectes amb controls positius de la soca homòloga o de qualsevol altra soca de referència de *C. m. subsp. sepedonicus*, suspesa en extracte de patata, tal com especifica l'apèndix 2 i, opcionalment, en tampó.

Si és possible, s'han d'utilitzar teixits infectats de forma natural (conservats mitjançant liofilització o

congelació a temperatures compreses entre -16 i -24°C) com a control similar, en el mateix portaobjectes.

Com a controls negatius, utilitzar alíquotes d'extractes de mostra que prèviament hagin proporcionat resultats negatius en la prova.

Utilitzar portaobjectes de vasets múltiples, preferentment amb 10 vasets de 6 mm de diàmetre com a mínim.

Processar el material de control de la mateixa manera que la mostra o les mostres.

4.1. Preparar els portaobjectes segons un dels procediments següents:

i) Per a precipitats amb una quantitat relativament petita de sediment de midó:

Abocar amb una pipeta un volum determinat (15 μl és suficient per a vasets de 6 mm de diàmetre; augmentar el volum si el diàmetre és més gran) d'una dilució a l'1/100 del precipitat de patata resuspès en el primer vaset. Posteriorment, abocar un volum similar de precipitat sense diluir (1/1) en els altres vasets de la fila. L'altra fila es pot utilitzar com a duplicat o per a una segona mostra, tal com indica la figura 1.

ii) Per a altres precipitats:

Preparar dilucions decimals (1/10 i 1/100) del precipitat resuspès en el tampó de precipitat. Abocar amb una pipeta un volum determinat (15 μl és suficient per a vasets de 6 mm de diàmetre; augmentar el volum si el diàmetre és més gran) del precipitat resuspès i de cada dilució en una de les files de vasets. L'altra fila es pot utilitzar com a duplicat o per a una segona mostra, tal com indica la figura 2.

4.2. Deixar assecar les gotetes a temperatura ambient o escalfant-les a una temperatura compresa entre 40 i 45°C .

Fixar les cèl·lules bacterianes al portaobjectes escalfant-lo (15 minuts a 60°C), flamejant-lo, mitjançant etanol al 95%, o d'acord amb les instruccions específiques dels proveïdors dels anticossos.

Si és necessari, els portaobjectes fixats es poden emmagatzemar congelats en una caixa seca durant el mínim temps possible (fins a un màxim de tres mesos) abans de realitzar noves proves.

4.3. Procediment IF:

i) si el portaobjectes s'ha preparat segons l'incís i) del punt 4.1:

Preparar un conjunt de dilucions a 1/2 de l'anticòs en el tampó IF. El primer vaset ha de tenir 1/2 del títol (T/2) i la resta 1/4 del títol (T/4), 1/2 del títol (T/2), el títol (T) i dues vegades el títol (2T),

ii) si el portaobjectes s'ha preparat segons l'incís ii) del punt 4.1:

Preparar la dilució de treball (DT) de l'anticòs en tampó IF. La dilució de treball afecta l'especificitat.

Figura 1. Preparació del portaobjectes d'acord amb el punt 4.1, incís i), i el punt 4.3, incís i).

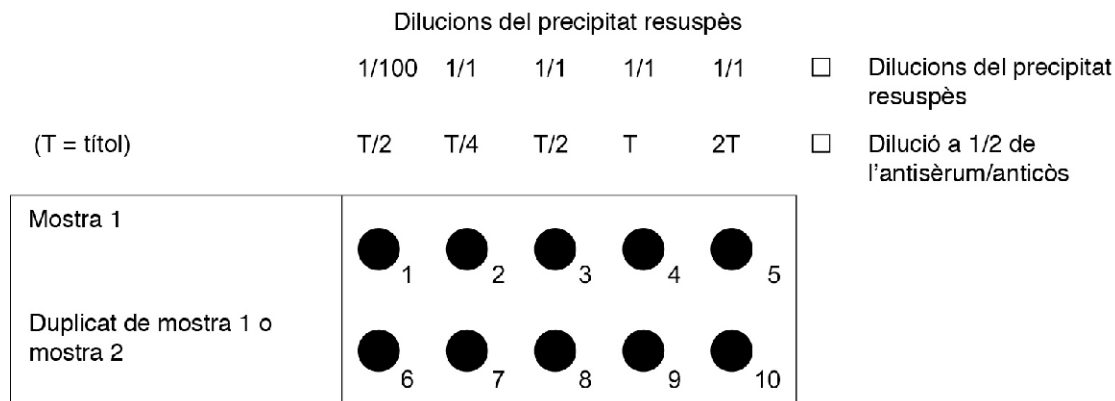
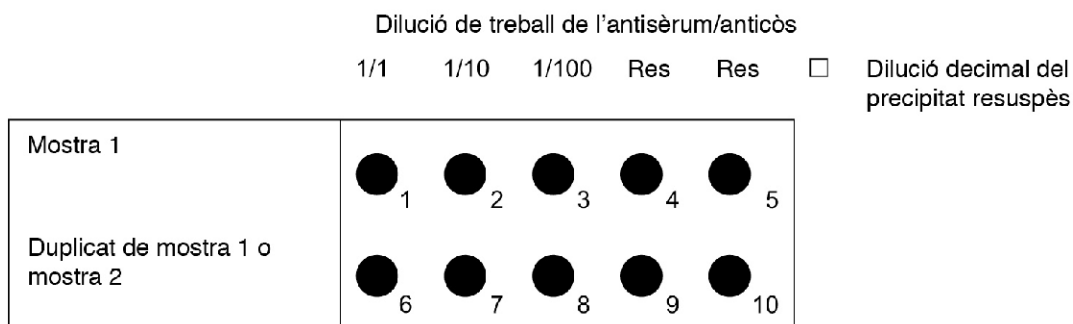


Figura 2. Preparació del portaobjectes d'acord amb el punt 4.1, incís ii), i el punt 4.3, incís ii).



4.3.1. Col·locar els portaobjectes en paper humitejat. Cobrir completament cada vaset amb la dilució o les dilucions de l'anticòs. El volum de l'anticòs aplicat en cada vaset ha de ser equivalent almenys al de l'extracte aplicat.

A falta d'instruccions específiques dels proveïdors d'anticossos, s'ha de seguir el procediment següent:

4.3.2. Tapar els portaobjectes i deixar incubar sobre paper humitejat durant 30 minuts a temperatura ambient (18 a 25°C).

4.3.3. Espolsar les gotetes de cada portaobjectes i esbandir acuradament amb tampó IF. Rentar per immersió durant 5 minuts en tampó IF-Tween (apèndix 3) i repetir l'operació durant 5 minuts en tampó IF. S'han d'evitar els aerosols o la transferència de gotetes que puguin provocar la contaminació encreuada. Eliminar acuradament l'excés d'humitat eixugant-los lleugerament.

4.3.4. Col·locar els portaobjectes en paper humitejat. Cobrir els vasets amb la dilució del conjugat FITC utilitzat per determinar el títol. El volum de conjugat aplicat en els vasets ha de ser idèntic al volum d'anticòs aplicat.

4.3.5. Tapar els portaobjectes i deixar incubar sobre paper humitejat durant 30 minuts a temperatura ambient (18 a 25°C).

4.3.6. Espolsar les gotetes de conjugat del portaobjectes. Esbandir i rentar com abans (punt 4.3.3). Retirar amb cura l'excés d'humitat.

4.3.7. Abocar amb una pipeta de 5 a 10 µl de tampó fosfat glicerol de 0,1 M (vegeu l'apèndix 3) o una solució comercial similar que protegeixi la fluorescència (antifàding) en cada vaset i tapar.

4.4. Lectura de la prova IF:

4.4.1. Examinar els portaobjectes en un microscopi epifluorescent amb filtres adequats perquè es produeixi l'excitació del FITC, amb oli o aigua d'immersió i a 500-1.000 augments. Recórrer els vasets al llarg de dos diàmetres perpendiculars entre si i al voltant del perímetre. En el cas de mostres que no presentin cèl·lules o només en presentin un petit nombre és necessari observar com a mínim 40 camps microscòpics.

En primer lloc, comprovar el control positiu. Les cèl·lules han de ser fluorescents brillants i estar completament tanyides al títol d'anticossos determinat o la dilució de treball. La prova IF (punt 4) s'ha de repetir si la tinció no és correcta.

4.4.2. Comprovar si hi ha cèl·lules fluorescents brillants amb la morfologia característica de *C. m. subsp. sepedonicus* en els vasets dels portaobjectes (vegeu el lloc web:

<http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

La intensitat de la fluorescència ha de ser equivalent a la de la soca de control positiu a la mateixa dilució de l'anticòs o millor que aquesta. S'han de descartar les cèl·lules que presentin una tinció incompleta o amb una fluorescència que sigui escassa.

En el cas que se sospiti qualsevol possible contaminació, s'ha de repetir la prova. Això pot ocórrer quan tots els portaobjectes d'un lot presentin cèl·lules positives a causa de la contaminació del tampó o quan es trobin cèl·lules positives (fora dels vasets) en la superfície del portaobjectes.

4.4.3. Hi ha diversos problemes inherents a l'especificitat de la prova d'immunofluorescència. En els precipitats de falques basals i seccions de tija de patata poden aparèixer poblacions de base de cèl·lules fluorescents de morfologia atípica i bacteris sapròfits amb reacció encreuada la mida i morfologia de les quals siguin similars als de *C. m. subsp. sepedonicus*.

4.4.4. Només s'han de prendre en consideració les cèl·lules fluorescents amb mida i morfologia típiques, al títol o la dilució de treball dels anticossos, de la mateixa manera que en el punt 4.3.

4.4.5. Interpretació dels resultats de la prova IF:

i) si es troben cèl·lules fluorescents brillants amb morfologia característica, calcular el nombre mitjà de cèl·lules típiques per camp microscòpic i el nombre de cèl·lules típiques per ml de precipitat resuspès (apèndix 4).

La prova IF és positiva per a les mostres que presentin almenys 5×10^3 cèl·lules típiques per ml de precipitat resuspès. La mostra es considera potencialment contaminada i és necessari realitzar noves proves,

ii) la prova IF és negativa per a les mostres que presentin menys de 5×10^3 cèl·lules per ml de precipitat resuspès i la mostra es considera negativa. No és necessari realitzar noves proves.

5. PROVA FISH

Principi:

Quan s'utilitzi la prova FISH com a primera prova de selecció i aquesta prova proporcioni resultats positius, s'ha de realitzar la prova IF com a segona prova obligatòria de selecció. Quan s'utilitzi la prova FISH com a segona prova de selecció i aquesta prova proporcioni resultats positius, és necessari realitzar les proves establertes en el diagrama de flux per completar el diagnòstic.

Nota: utilitzar oligosondes específiques per a *C. m. subsp. sepedonicus* validades (apèndix 7). Les proves preliminars realitzades amb aquest mètode han de permetre la detecció reproducible d'almenys 10^3 - 10^4 cèl·lules de *C. m. subsp. sepedonicus* per ml afegides als extractes de mostres que prèviament van proporcionar resultats negatius.

El procediment següent s'hauria de portar a terme, si pot ser, amb extracte de mostra que s'acabi de preparar, però també es pot realitzar amb extracte de mostra que s'hagi emmagatzemat en glicerol a una temperatura compresa entre -16 i -24°C o entre -68 i -86°C .

Com a controls negatius, s'han d'utilitzar alíquotes d'extracte de mostra que prèviament hagi donat resultats negatius per a *C. m. subsp. sepedonicus*.

Com a controls positius, s'han de preparar suspensions que continguin de 10^5 a 10^6 cèl·lules per ml de *C. m. subsp. sepedonicus* (per exemple, la soca NCPPB 4053, o PD 406) en tampó fosfat de concentració 0,01 M d'un cultiu de 3 a 5 dies (per a la preparació vegeu l'apèndix 2). Preparar en un altre portaobjectes controls positius de la soca homòloga o de qualsevol altra soca de referència de *C. m. subsp. sepedonicus*, suspesa en extracte de patata, tal com especifica l'apèndix 2.

L'ús d'una oligosonda eubacteriana marcada amb FITC ofereix un control per al procés d'hibridació, atès que tenyeix tots els eubacteris que estiguin presents en la mostra.

Processar el material de control de la mateixa manera que la mostra o les mostres.

5.1. Fixació de l'extracte de patata

El protocol següent es basa en Wullings *et al.*, (1998):

5.1.1. Preparar la solució de fixació (vegeu l'apèndix 7).

5.1.2. Abocar 100 μl de cada extracte de mostra en un tub Eppendorf i centrifugar durant 8 minuts a 7.000 g.

5.1.3. Treure el sobrenedant i dissoldre el precipitat en 500 μl de solució fixadora preparada amb menys de 24 hores d'antelació. Agitar i incubar d'un dia per a un altre a 4°C .

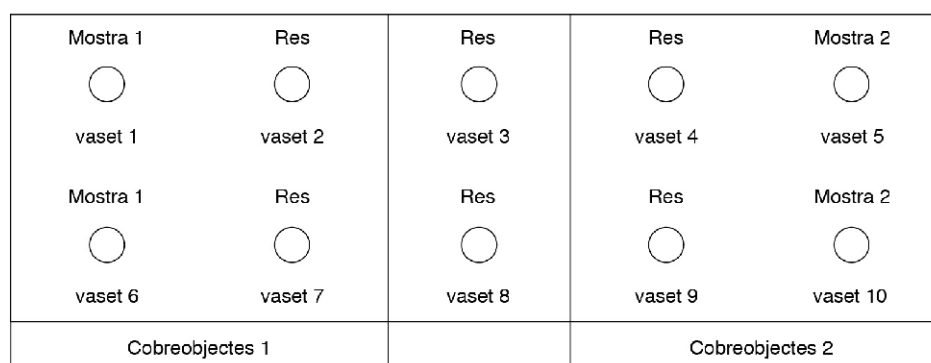
L'etanol al 96% constitueix una solució fixadora alternativa. Per utilitzar-lo, dissoldre el precipitat a partir del pas 5.1.2. en 50 μl de tampó fosfat de concentració 0,01 M i 50 μl d'etanol al 96%. Agitar la mescla i incubar a 4°C durant 30 a 60 minuts.

5.1.4. Centrifugar durant 8 minuts a 7.000 g, treure el sobrenedant i resuspendre el precipitat en 75 μl de tampó fosfat de concentració 0,01 M (vegeu l'apèndix 3).

5.1.5. Col·locar 16 μl de les suspensions fixades en un portaobjectes múltiple net, tal com mostra la figura 3. Aplicar dues mostres diferents per portaobjectes sense diluir i utilitzar 10 μl per realitzar una dilució a l'1:100 (en tampó fosfat de concentració 0,01 M). La solució de la mostra restant (49 μl) es pot emmagatzemar a -20°C després de l'addició d'1 volum d'etanol al 96%. En cas que sigui necessari, repetir la prova FISH, separar l'etanol mitjançant centrifugació i afegir un volum equivalent de tampó fosfat de concentració 0,01 M (mesclar mitjançant agitació).

Figura 3:

Distribució del portaobjectes per a la prova FISH



5.1.6. Assecar els portaobjectes a l'aire (o amb assecador de portaobjectes a 37°C) i fixar-los flamejant-los.

El procediment es pot interrompre en aquesta fase, i la hibridació es pot prosseguir l'endemà. Els portaobjectes s'han d'emmagatzemar secs i sense pols, a temperatura ambient.

5.2. Prehibridació i hibridació

5.2.1. Preparar una solució de lisozima que contingui 10 mg de lisozima (Sigma L-6876) en 10 ml de tampó (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8,0). Aquesta solució es pot emmagatzemar però només s'ha de congelar i descongelar una vegada. Cobrir bé totes les mostres o amb aproximadament 50 µl de solució de lisozima i incubar durant 10 minuts a temperatura ambient. Submergir els portaobjectes en aigua desmineralitzada una única vegada i eixugar amb paper de filtre.

Alternativament, en lloc de lisozima, afegir 50 µl de 40-400 µg ml⁻¹ de proteïnasa K en tampó (20 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl₂, pH 7,4) en cada vaset i incubar a 37°C durant 30 minuts.

5.2.2. Deshidratar les cèl·lules en sèries d'etanol escalonades al 50%, 80% i 96% durant 1 minut cadascuna. Assecar les preparacions en un portaobjectes.

5.2.3. Preparar una cambra d'incubació humida recobrint el fons d'una caixa hermètica amb un mocador de paper o paper de filtre amarant en 1x HybMix (apèndix 7). Preincubar la caixa en el forn d'hibridació a 55°C durant 10 minuts com a mínim.

5.2.4. Preparar la solució d'hibridació (apèndix 7) amb 45 µl per portaobjectes, i preincubar durant 5 minuts a 55°C.

5.2.5. Col·locar els portaobjectes en una placa calenta a 45°C i aplicar 10 µl de solució d'hibridació a cadascun dels 4 vasos del portaobjectes o dels portaobjectes.

5.2.6. Aplicar dos cobreobjectes (24 x 24 mm) a cada portaobjectes evitant l'entrada d'aire. Col·locar els portaobjectes en la cambra humida preescalfada i deixar que es produeixi la hibridació d'un dia per a l'altre a 55°C en la foscor.

5.2.7. Preparar tres vasos de precipitat que continguin 1 l d'aigua ultrapura, 1 l d'1x HybMix (334 ml 3x HybMix i 666 ml d'aigua ultrapura) i 1 l d'1/2x HybMix (167 ml

3x HybMix i 833 ml d'aigua ultrapura). Preincubar-los al bany maria a 55°C.

5.2.8. Treure els cobreobjectes dels portaobjectes i col·locar els portaobjectes en un suport.

5.2.9. Rentar l'excés de sonda mitjançant incubació durant 15 minuts en el vas de precipitat amb 1x HybMix a 55°C.

5.2.10. Transferir el portaobjectes a una solució de rentatge d'HybMix a l'1/2 i incubar durant 15 minuts més.

5.2.11. Submergir les preparacions breument en aigua ultrapura i col·locar-les en paper de filtre. Eliminar l'excés d'humitat cobrint la superfície amb compte amb paper de filtre. Abocar de 5 a 10 µl de solució de muntatge protectora de la fluorescència (per exemple, Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA, o equivalent) en cada vaset i aplicar un cobreobjectes gran (24 x 60 mm) sobre la totalitat dels portaobjectes.

5.3. Lectura de la prova FISH:

5.3.1. Els portaobjectes s'han d'examinar immediatament utilitzant un microscopi epifluorescent a 630 o 1.000 augments amb oli d'immersió. Amb un filtre adequat per a isotiocianat de fluoresceïna (FITC), les cèl·lules eubacterianes (incloses la majoria de les cèl·lules gramnegatives) de la mostra apareixen tenyides de verd fluorescent. Utilitzant un filtre per a tetrametilrodamina-5-isotiocianat, les cèl·lules de *C. m. subsp. sepedonicus* marcades amb Cy3 apareixen tenyides de vermell fluorescent. Comparar la morfologia de les cèl·lules amb la dels controls positius. Les cèl·lules han de ser fluorescent brillant i estar completament tenyides.

S'ha de repetir la prova FISH (punt 9.4) si la tinció és aberrant. Recórrer els vasos al llarg de dos diàmetres perpendiculars entre si i al voltant del perímetre. En el cas de mostres que no presentin cèl·lules o només en presentin un petit nombre és necessari observar com a mínim 40 camps microscòpics.

5.3.2. Comprovar si hi ha cèl·lules fluorescent brillant amb la morfologia característica de *C. m. subsp. sepedonicus* en els vasos dels portaobjectes (vegeu el lloc web: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). La intensitat de la fluorescència ha de ser millor que la de la soca de control positiu o bé equivalent. S'han

de descartar les cèl·lules que presentin una tinció incompleta o amb una fluorescència que sigui escassa.

5.3.3. En el cas que se sospiti qualsevol possible contaminació, s'ha de repetir la prova. Això pot ocórrer quan tots els portaobjectes d'un lot presentin cèl·lules positives a causa de la contaminació del tampó o quan es trobin cèl·lules positives (fora dels vasets) en la superfície del portaobjectes.

5.3.4. Hi ha diversos problemes inherents a l'especificitat de la prova FISH. En els precipitats de falques basals i seccions de tija de patata poden aparèixer poblacions de base de cèl·lules fluorescents de morfologia atípica i bacteris sapròfits amb reacció encruada la mida i morfologia de les quals siguin similars als de *C. m. subsp. sepedonicus*, encara que amb molta menys freqüència que en la prova IF.

5.3.5. Només s'han de tenir en compte les cèl·lules fluorescents de mida i morfologia típiques (vegeu el punt 5.3.2).

5.3.6. Interpretació dels resultats de la prova FISH:

i) s'obtenen resultats vàlids en la prova FISH sempre que en tots els controls positius i en cap dels controls negatius s'observin cèl·lules tenyides de verd fluorescent brillant, la mida i morfologia de les quals siguin les típiques de les de *C. m. subsp. sepedonicus*, quan s'utilitzi el filtre FITC, i cèl·lules tenyides de vermell fluorescent brillant, quan s'utilitzi el filtre de rodamina. Si es troben cèl·lules fluorescent brillant amb morfologia característica, calcular el nombre mitjà de cèl·lules típiques per camp microscòpic i el nombre de cèl·lules típiques per ml de precipitat resuspès (apèndix 4). Les mostres que presentin almenys 5×10^3 cèl·lules típiques per ml de precipitat resuspès es consideren potencialment contaminades i és necessari realitzar noves proves. Les mostres que presentin menys de 5×10^3 cèl·lules típiques per ml de precipitat resuspès es consideren negatives,

ii) els resultats de la prova FISH són negatius quan, utilitzant el filtre de rodamina, no s'observin cèl·lules tenyides de vermell fluorescent brillant amb una mida i morfologia típiques de *C. m. subsp. sepedonicus*, sempre que s'observin cèl·lules tenyides de vermell fluorescent brillant típiques en les preparacions de control positiu quan s'utilitzi el filtre de rodamina.

6. PROVA PCR

Principi:

Quan s'utilitzi la prova PCR com a principal prova de selecció i aquesta prova proporcioni resultats positius, s'ha de realitzar la prova IF com a segona prova obligatòria de selecció. Quan s'utilitzi la prova PCR com segona prova de selecció i aquesta prova proporcioni resultats positius, és necessari realitzar les proves establertes en el diagrama de flux per completar el diagnòstic.

La plena explotació d'aquest mètode com a principal mètode de selecció només es recomana en cas que s'hagin adquirit coneixements especialitzats del mètode.

Nota: les proves preliminars realitzades amb aquest mètode han de permetre la detecció reproducible de 10^3 a 10^4 cèl·lules de *C. m. subsp. sepedonicus* per ml afegides als extractes de mostres que prèviament van proporcionar resultats negatius. Pot ser necessari portar a terme experiments d'optimització per aconseguir nivells màxims de sensibilitat i especificitat en tots els laboratoris.

S'han d'utilitzar reactius i protocols PCR validats. Seleccionar preferiblement un mètode amb control intern.

Prendre les precaucions necessàries per evitar la contaminació de la mostra amb l'ADN buscat. La prova PCR l'han de portar a terme tècnics experimentats en laboratoris especialitzats en biologia molecular, amb la finalitat de reduir al màxim la possibilitat de contaminació amb l'ADN buscat.

Com a prova final del procediment, sempre s'han d'efectuar controls negatius (extracció d'ADN i PCR) que deixin constància que no s'ha produït arrossegament d'ADN.

En la prova PCR s'han d'incloure els controls negatius següents:

- extracte de la mostra que prèviament hagi proporcionat resultats negatius per a *C. m. subsp. sepedonicus*,
- controls de tampó utilitzats per extreure el bacteri i l'ADN de la mostra,
- mescla per a la reacció PCR.

S'hi han d'incloure els controls positius següents:

- alíquotes dels precipitats resuspesos als quals s'hagi afegit *C. m. subsp. sepedonicus* (per a la preparació, vegeu l'apèndix 2),
- una suspensió de 10^6 cèl·lules per ml de *C. m. subsp. sepedonicus* en aigua d'un aïllat virulent (per exemple, NCPPB 2140 o NCPPB 4053),
- sempre que sigui possible, també utilitzar ADN extret de les mostres de control positives en la prova PCR.

Per evitar qualsevol possible contaminació, preparar els controls positius en un entorn diferent al de les mostres que s'hagin de sotmetre a prova.

Els extractes de mostres han d'estar lliures de terra en la mesura que sigui possible. En determinats casos pot ser recomanable preparar les extraccions a partir de patates rentades quan s'hagin d'utilitzar protocols PCR.

6.1. Mètodes de purificació de l'ADN

Utilitzar mostres de control positives i negatives, com s'indica més amunt.

Processar el material de control de la mateixa manera que la mostra o les mostres.

Per purificar l'ADN buscat a partir de substrats de mostres complexes, hi ha diversos mètodes que eliminen els inhibidors de PCR i altres reaccions enzimàtiques i concentren l'ADN buscat en l'extracte de la mostra.

El mètode següent ha estat optimitzat per utilitzar-lo amb el mètode PCR validat que figura en l'apèndix 6.

6.1.a) Mètode de Pastrok (2000):

1. Abocar amb una pipeta 220 µl de tampó de lisi (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) en un tub Eppendorf d'1,5 ml.
2. Afegir 100 µl d'extracte de mostra i col·locar en un escalfador o al bany maria a 95°C durant 10 minuts.
3. Col·locar el tub en gel durant 5 minuts.
4. Afegir 80 µl de solució mare de lisozima (50 mg de lisozima per ml en 10 mM Tris HCl, pH 8,0) i incubar a 37°C durant 30 minuts.
5. Afegir 220 µl de solució A Easy DNA® (Invitrogen), mesclar adequadament per agitació i incubar a 65°C durant 30 minuts.
6. Afegir 100 µl de solució B Easy DNA® (Invitrogen) i agitar vigorosament fins que el precipitat es mogui lliurement en el tub i la mostra sigui uniformement viscosa.
7. Afegir 500 µl de cloroform i agitar fins que disminueixi la viscositat i la mescla sigui homogènia.
8. Centrifugar a 15.000 g durant 20 minuts a 4°C per separar les fases i formar la interfase.
9. Transferir la fase superior a un tub Eppendorf sense utilitzar.
10. Afegir 1 ml d'etanol al 100% (-20°C), agitar breument i incubar en gel durant 10 minuts.
11. Centrifugar a 15.000 g durant 20 minuts a 4°C i retirar l'etanol del precipitat.
12. Afegir 500 µl d'etanol al 80% (-20°C) i mesclar invertint el tub.
13. Centrifugar a 15.000 g durant 10 minuts a 4°C, guardar el precipitat i retirar l'etanol.
14. Deixar que el precipitat s'assequi a l'aire o en un Speed Vac d'ADN.
15. Resuspendre el precipitat en 100 µl d'aigua ultrapura estèril i deixar a temperatura ambient durant un mínim de 20 minuts.
16. Emmagatzemar a -20°C fins que es necessiti per a PCR.
17. Decantar qualsevol precipitat blanc mitjançant centrifugació, i utilitzar 5 µl del sobrenedant que contingui ADN per a la prova PCR.

6.1.b) Altres mètodes

Es poden aplicar altres mètodes d'extracció d'ADN (com per exemple, Qiagen DNeasy Plant Kit) sempre que hagin demostrat que són igual d'eficaços per purificar l'ADN de mostres de control que continguin de 10³ a 10⁴ cèl·lules patògenes per ml.

6.2. PCR

6.2.1. Preparar els assajos control de PCR d'acord amb el protocol validat (apèndix 6). Preparar una dilució decimal d'extracte d'ADN de la mostra (1:10 en aigua ultrapura).

6.2.2. Preparar la mescla de reacció PCR adequada en un entorn lliure de contaminació d'acord amb el

protocol publicat (apèndix 6). El protocol PCR validat és una reacció «multiplex» que també incorpora un protocol PCR intern.

6.2.3. Afegir 5 µl d'extracte d'ADN per 25 µl de reacció PCR en tubs PCR estèrils.

6.2.4. Incorporar una mostra de control negativa que contingui només mescla de reacció PCR i afegir la mateixa font d'aigua ultrapura utilitzada en la mescla PCR en lloc de la mostra.

6.2.5. Col·locar els tubs en el mateix termociclador utilitzat en les proves preliminars i aplicar el programa PCR optimitzat adequat (apèndix 6).

6.3. Anàlisi del producte de la PCR

6.3.1. Confirmar els amplicons PCR mitjançant electroforesi en gel d'agarosa. Córrer almenys 12 µl de mescla de reacció d'ADN amplificada de cada mostra mesclada amb 3 µl de tampó de càrrega (apèndix 6) en un gel d'agarosa al 2,0% (p/v) en tampó tris-acetat-EDTA (TAE) (apèndix 6) a 5-8 V per cm. Utilitzar un marcador d'ADN adequat, per exemple, 100 bp ladder.

6.3.2. Revelar les bandes d'ADN mitjançant la tinció amb bromur d'etidi (0,5 mg per l) durant 30 a 45 minuts, prenent les precaucions adequades per manejar aquest mutagen.

6.3.3. En el cas dels productes PCR amplificats de la mida esperada (apèndix 6), visualitzar el gel tenyit mitjançant transil·luminació UV d'ona curta (per exemple, = 302 nm) i anotar els resultats.

6.3.4. Per a tots els resultats o casos nous, verificar l'autenticitat de l'amplicó de PCR realitzant una anàlisi amb enzim de restricció en una mostra de l'ADN amplificat restant mitjançant la incubació a la temperatura òptima i durant el temps necessari amb una enzim i tampó adequats (vegeu l'apèndix 6). Confirmar els fragments digerit mitjançant electroforesi en gel d'agarosa, seguint el mètode indicat abans, i observar el patró característic del fragment de restricció amb transil·luminació UV una vegada tenyit amb bromur d'etidi i comparar amb el control positiu no digerit i digerit.

Interpretació dels resultats de la prova PCR

La prova PCR és negativa si l'amplicó PCR específic de la *C. m. subsp. sepedonicus* de la mida esperada no es detecta en la mostra en qüestió però sí que es detecta en totes les mostres dels controls positius (en el cas de PCR «multiplex» amb encebadors de control intern específics de la planta, s'ha d'amplificar amb la mostra en qüestió un segon producte PCR de la mida esperada).

La prova PCR és positiva si es detecta l'amplicó PCR específic de la *C. m. subsp. sepedonicus* de la mida i patró de restricció (quan sigui necessari) esperats, sempre que no s'amplifiqui a partir de cap de les mostres dels controls negatius. La confirmació fiable d'un resultat positiu també es pot obtenir repetint la prova amb un segon conjunt d'encebadors PCR (punt 9.3).

Nota: es pot sospitar la inhibició de la PCR si l'amplicó esperat s'obté de la mostra de control positiva que conté *C. m. subsp. sepedonicus* en aigua però s'obtenen resultats negatius dels controls positius amb *C. m. subsp. sepedonicus* en extracte de patata. En protocols PCR «multiplex» amb controls PCR interns, la inhibició de la reacció apareix indicada quan no s'obté cap dels dos amplicons.

Es pot sospitar l'existència de contaminació si l'amplicó esperat s'obté a partir d'un o diversos dels controls negatius.

7. PROVA DE BIOASSAIG

Nota: les proves preliminars realitzades amb aquest mètode han de permetre la detecció reproduïble de 10^3 a 10^4 unitats de formació de colònies de *C. m. subsp. sepedonicus* per ml afegides als extractes de mostres que prèviament van proporcionar resultats negatius (per a la preparació vegeu l'apèndix 2).

La màxima sensibilitat de detecció s'assoleix quan s'utilitzin extractes de mostres que s'acabin de preparar i quan les condicions de cultiu siguin les òptimes. No obstant això, aquest mètode també es pot aplicar amb èxit a extractes que s'hagin emmagatzemat en glicerol a una temperatura compresa entre -68 i -86°C .

Algunes varietats d'albergínia constitueixen un medi d'enriquiment selectiu excel·lent per a la proliferació de *C. m. subsp. sepedonicus*, fins i tot quan no hi ha símptomes, i també faciliten una prova confirmatòria d'hoste excel·lent.

Les condicions de cultiu han de ser òptimes per reduir el risc d'obtenir falsos resultats negatius en les proves.

Per a més detalls sobre el cultiu, vegeu l'apèndix 8.

7.1. Distribuir la totalitat de l'alíquota de prova sobrant del precipitat resuspès dels punts 3.1.6 o 3.2.5 entre les albergínies, seguint un dels mètodes que s'exposen a continuació (7.3 o 7.4). Utilitzar exclusivament plantes que estiguin en la fase foliar 2-3 i fins a la plena expansió de la tercera fulla verdadera. A fi de garantir la utilització completa del precipitat resuspès, així com la inoculació efectiva, es requereixen entre 15 i 25 albergínies per mostra per als procediments que s'esbossen a continuació.

7.2. Les albergínies no s'han de regar d'un a dos dies abans de la inoculació per reduir la pressió de turgència.

7.3. Inoculació en estries.

7.3.1. Sostenint la planta entre dos dits s'ha d'aplicar amb una pipeta una gota (d'uns 5-10 μl) del precipitat en suspensió en la tija situada entre els cotilèdons i la primera fulla.

7.3.2. Amb un bisturí estèril practicar una incisió diagonal d'aproximadament 1,0 cm de llarg i una profunditat d'aproximadament 2/3 del gruix de la tija, començant el tall a partir de la gota del precipitat.

7.3.3. Segellar el tall amb vaselina estèril amb una xeringa.

7.4. Inoculació amb xeringa

Inocular les tiges de l'albergínia just per damunt dels cotilèdons utilitzant una xeringa proveïda d'agulla hipodèrmica (almenys 23G). Distribuir la mostra entre les albergínies.

7.5. Com a controls positius, inocular cinc plantes amb una suspensió aquosa de 10^5 a 10^6 cèl·lules per ml d'un cultiu conegut de *C. m. subsp. sepedonicus* i, sempre que sigui possible, amb teixit de tubercle infectat de forma natural (vegeu el punt 4) mitjançant el mateix mètode d'inoculació (7.3 o 7.4).

7.6. Com a control negatiu, inocular cinc plantes amb tampó de precipitat estèril mitjançant el mateix mètode d'inoculació (7.3 o 7.4).

7.7. Incubar les plantes en instal·lacions adequades per a la quarantena durant un màxim de 4 setmanes a una temperatura de 18 a 24°C . Incubar les plantes amb suficient llum i un elevat nivell d'humitat (70 a 80%) i aigua, evitant que l'aigua s'estanqui i que les plantes es marceixin per falta d'aigua. Les cèl·lules de *C. m. subsp. sepedonicus* moren a temperatures superiors a 30°C i la temperatura òptima és de 21°C . Per evitar la contaminació s'han d'incubar les plantes de control positiu i negatiu en bancs clarament separats en un hivernacle o cambra de cultiu; en cas que es disposi d'un espai reduït, s'ha de garantir l'estricta separació entre tractaments. En cas que plantes per a diferents mostres s'hagin d'incubar juntes, s'han de separar amb les pantalles adequades. Durant la fertilització, el reg, la inspecció i qualsevol altra manipulació s'han d'extremar les precaucions per evitar la contaminació encreuada. És essencial mantenir els hivernacles i les cambres lliures de qualsevol plaga d'insectes, atès que els insectes poden transmetre el bacteri d'una mostra a una altra.

7.8. Transcorreguda una setmana, examinar-los amb regularitat a fi de detectar els símptomes. Comptar el nombre de plantes que mostrin símptomes. *C. m. subsp. sepedonicus* provoca la marcescència de les fulles en les albergínies, que es pot iniciar amb flacciditat internerviosa o de les vores. El teixit marcit pot aparèixer al principi de color verd fosc o clapejat, però es torna més pàl·lid abans de necrosar-se. Les zones de marcescència internervioses solen tenir un aspecte gras o humit com amarats en aigua. El teixit necrosat presenta a vegades una vora groc brillant. Les plantes no estan necessàriament mortes; com més tarden a aparèixer els símptomes, més gran és la possibilitat de supervivència. Les plantes poden superar la infecció. Les albergínies joves són molt més sensibles a les poblacions baixes de *C. m. subsp. sepedonicus* que les plantes de més edat, i per això és necessari utilitzar plantes en l'estadi foliar 3, o immediatament abans d'aquest estadi.

El marcescència també pot ser induït per poblacions d'uns altres bacteris o fongs presents en el precipitat de teixit tuberós. S'hi inclouen *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* i *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *Erwinia chrysanthemi*, *Phoma exigua* var. *foveata*, així com grans poblacions de

bacteris sapròfits. En particular, *Erwinia chrysanthemi* pot provocar símptomes i marciment en les fulles molt semblants als de *C. m. subsp. sepedonicus*. L'única diferència en el cas de les infeccions causades per *Erwinia chrysanthemi* és l'ennegriments de les tiges. Aquest marciment es pot distingir del causat per *C. m. subsp. sepedonicus*, perquè es marceixen ràpidament fulles o plantes senceres. També es pot preparar una tinció de Gram, i aquesta prova diferencia *C. m. subsp. sepedonicus* d'*Erwinia* ssp.

7.9. Tan aviat com s'observin símptomes en les albergínies s'ha de procedir a fer-ne el reaïllament, utilitzant seccions de teixit foliar o de la tija de les plantes marcides (vegeu el punt 3.1.3 per a la maceració del teixit). Desinfectar la superfície de les fulles i tiges d'albergínia fregant-les amb etanol al 70%. Realitzar una prova IF o PCR amb la saba de la planta d'albergínia i aïllar en medis (selectius) adequats (vegeu el punt 8). També es pot preparar una tinció de Gram (apèndix 9). Identificar els cultius purificats de presumpta *C. m. subsp. sepedonicus* i confirmar-ne la patogenicitat (vegeu les seccions 9 i 10).

7.10. En determinades circumstàncies, en particular quan les condicions de cultiu no siguin òptimes, pot ocórrer que *C. m. subsp. sepedonicus* estigui present de forma latent en les albergínies, fins i tot després de períodes d'incubació de fins a 4 setmanes. En cas que, transcorregudes 4 setmanes, no s'observin símptomes, realitzar una prova IF/PCR amb una mostra mixta de seccions de tija d'1 cm de cada planta preses per damunt de la secció d'inoculació. Si els resultats de la prova són positius, s'ha de procedir al fer-ne el reaïllament en medis (selectius) adequats d'acord amb el procediment que descriu el punt 8. Identificar els cultius purificats de possible *C. m. subsp. sepedonicus* i confirmar-ne la patogenicitat (seccions 9 i 10).

Interpretació dels resultats de la prova del bioassaig

S'obtenen resultats vàlids en la prova del bioassaig quan les plantes de control positiu mostrin símptomes típics, es puguin reaïllar els bacteris d'aquestes plantes i no es detectin símptomes en els controls negatius.

Els resultats de la prova del bioassaig són negatius si les plantes sotmeses a la prova no estan infectades per *C. m. subsp. sepedonicus* i sempre que es detecti la *C. m. subsp. sepedonicus* en els controls positius.

Els resultats de la prova del bioassaig són positius quan les plantes sotmeses a la prova estiguin infectades per *C. m. subsp. sepedonicus*.

8. AÏLLAMENT DE *C. m. subsp. sepedonicus*

Nota: el diagnòstic només està complet quan s'hagi aïllat i identificat (vegeu el punt 9) *C. m. subsp. sepedonicus*, i posteriorment confirmat mitjançant una prova de patogenicitat (punt 10). Encara que *C. m. subsp. sepedonicus* és un organisme delicat, es pot aïllar a partir de teixit simptomàtic.

No obstant això, es pot veure inhibida pels bacteris sapròfits que proliferen ràpidament i, per tant, els aïllaments directes a partir del precipitat de teixit tuberós o de la tija (punt 3.1.6. o 3.2.5.) són difícils. L'aïllament directe de *C. m. subsp. sepedonicus* es pot realitzar amb un medi selectiu i la dilució adequada del precipitat resuspès de les falques basals o tiges de patates.

Els aïllaments s'han de realitzar amb tots els tubercles o seccions de tija de patata simptomàtics i amb les albergínies en què no s'observin símptomes però amb què la prova IF/PCR realitzada a partir de la mostra mixta hagi donat resultats positius (vegeu el punt 7.10). Quan sigui necessari, la maceració de les tiges d'albergínia s'ha de realitzar seguint el procediment que descriu el punt 3.1.3.

Com a controls positius, preparar dilucions decimals a partir d'una suspensió de 10^6 cfu per ml de *C. m. subsp. sepedonicus* (per exemple, NCPPB 4053 o PD 406). Per evitar qualsevol possibilitat de contaminació, preparar els controls positius separatament de les mostres que s'hagin de sotmetre a prova.

Cada lot de medi selectiu que es prepari s'ha de sotmetre a prova a fi de determinar-ne la idoneïtat per al cultiu del patogen abans d'utilitzar-lo en proves amb mostres rutinàries.

Processar el material de control de la mateixa manera que la mostra o les mostres.

8.1. Sembrar en medi selectiu

8.1.1. A partir d'una alíquota de 100 µl d'una mostra de precipitat de patata resuspès o de saba d'albergínia, realitzar dilucions decimals en tampó de precipitat (apèndix 3).

8.1.2. L'aïllament a partir de precipitat de patata sense diluir no sol funcionar a causa de la lentitud de creixement de *C. m. subsp. sepedonicus* i de la competència de sapròfits. Atès que en els teixits infectats sol haver-hi poblacions elevades del bacteri, els sapròfits es dilueixen normalment, mentre que el patogen persisteix. Per tant, es recomana recórrer a la tècnica de l'extensió en placa i estendre, amb ajuda d'un nansa d'extensió («pals d'hoquei»), 100 µl de cadascuna de les mostres, en dilucions d'1/100 fins a 1/10 000, en el medi MTNA o NCP-88 (apèndix 5) (si s'utilitzen plaques de Petri de 90 mm de diàmetre, se n'ha d'ajustar el volum per a mides alternatives de placa).

Nota: una altra estratègia alternativa consisteix a estendre l'alíquota inicial de 100 µl de precipitat de patata en una primera placa d'agar amb ajuda d'un aplicador i posteriorment estendre, en estries, tots els residus que quedin en l'aplicador en una segona placa d'agar. Finalment, repetir amb una tercera placa, i aconseguir així, mitjançant l'aplicador, l'efecte de dilució en les plaques.

8.1.3. Incubar les plaques en la foscor a una temperatura de 21 a 23°C.

8.1.4. Les observacions inicials de les plaques, inclosos els recomptes de colònies típiques de la *C. m.* subsp. *sepedonicus* en relació amb les plaques de control, es realitzen 3 dies després, amb recomptes posteriors transcorreguts 5 dies, 7 dies i, finalment, 10 dies.

8.2. Purificació de les colònies sospitoses

Nota: el subcultiu de colònies d'aspecte similar a *C. m.* subsp. *sepedonicus* s'ha de realitzar en medis YMG per a la inoculació d'albergínies i/o la identificació posterior. Això s'ha de realitzar abans que les plaques creixin massa, és a dir, preferiblement transcorreguts de 3 a 5 dies.

8.2.1. Practicar una sembra en estries de colònies d'aspecte similar a la *C. m.* subsp. *sepedonicus* en la superfície d'un dels medis següents (apèndix 5): agar de dextrosa nutritiu (NAD) (per utilitzar-lo exclusivament en el subcultiu), agar de llevat, peptona, glucosa (YPGA), agar d'extracte de llevat, sals minerals (YGM).

Incubar a 21–24°C durant 10 dies com a màxim.

C. m. subsp. *sepedonicus* creix lentament i sol provocar unes colònies puntejades, de color crema, de forma de volta, en el termini de deu dies. [Fotos de colònies típiques de *C. m.* subsp. *sepedonicus* (vegeu el lloc web:

<http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>].

8.2.2. Tornar a sembrar en estries per obtenir cultius purs.

El ritme de creixement millora amb subcultius. Les colònies típiques són de color blanc crema o marfil, groc en ocasions, arrodonides, llises, voluminoses, voltades en forma convexa, mucosofluides, amb vores intactes i normalment d'un diàmetre d'1 a 3 mm.

Una simple tinció de Gram (apèndix 9) pot resultar útil per seleccionar colònies per a proves posteriors.

8.2.3. Identificar els suposats cultius (vegeu el punt 9) i realitzar una prova de patogenicitat (vegeu el punt 10).

9. IDENTIFICACIÓ

Identificar cultius purs de possibles aïllats de *C. m.* subsp. *sepedonicus*, utilitzant almenys dues de les proves següents basades en principis biològics diferents.

Quan escaigui, incloure soques de referència conegudes per a cada prova efectuada, com a controls positius.

9.1. Proves d'identificació nutricional i enzimàtica

Determinar les propietats fenotípiques següents que estiguin universalment presents o absents en la *C. m.* subsp. *sepedonicus*, d'acord amb els mètodes de Lelliott i Stead (1987), Klement *et al.* (1990), Schaad (2001), Anònim (1987).

Incubar tots els medis a 21°C i examinar-los transcorreguts 6 dies. Si no se n'ha produït creixement, incubar-los 20 dies.

En totes les proves s'ha d'incloure un control conegut de *C. m.* subsp. *sepedonicus*. Les proves fisiològiques i nutricionals s'han de realitzar utilitzant inoculacions de subcultius en agar nutritiu. Les comparacions

morfològiques s'han de realitzar a partir de cultius d'agar de dextrosa nutritius.

| Proves | Resultat esperat |
|--------------------------------------|------------------------------|
| Prova de l'oxidació/fermentac. (O/F) | Inert o lleugerament oxidant |
| Activitat oxidasa | – |
| Creixement a 37°C | – |
| Activitat ureasa | – |
| Hidròlisi de l'esculina | + |
| Hidròlisi del midó | – o feble |
| Tolerància de NaCl al 7% | – |
| Producció d'indol | – |
| Activitat catalasa | + |
| Producció d'H ₂ S | – |
| Utilització de citrat | – |
| Liqüefacció de la gelatina | – |
| Producció d'àcid de glicerol | – |
| Producció d'àcid de lactosa | – o feble |
| Producció d'àcid de ramnosa | – |
| Producció d'àcid de salicina | – |
| Tinció de Gram (apèndix 9) | + |

9.2. Prova IF

a) Preparar una suspensió d'aproximadament 10⁶ cèl·lules per ml en tampó IF (apèndix 3).

b) Preparar una sèrie de dilucions a 1/2 d'un antisèrum adequat.

c) Aplicar el procediment IF (punt 4).

d) La prova IF és positiva si el títol IF del cultiu és equivalent al del control positiu.

9.3. Prova PCR

a) Preparar una suspensió d'aproximadament 10⁶ cèl·lules per ml en aigua ultrapura.

b) Escalfar 100 µl de la suspensió cel·lular en tubs tancats en un escalfador o al bany maria a 100°C durant 4 minuts. Si és necessari, l'addició de NaOH recent preparat a una concentració final de 0,05 M pot ajudar a la lisi cel·lular. Llavors les mostres es poden emmagatzemar a una temperatura de –16 a –24°C fins que sigui necessari.

c) Aplicar els procediments PCR adequats per amplificar els amplicons específics de *C. m.* subsp. *sepedonicus* (per exemple, Pastrik, 2000; vegeu l'apèndix 4; Li i de Boer, 1995; Mills *et al.*, 1997; Pastrik i Rainey, 1999; Schaad *et al.*, 1999).

d) S'aconsegueix la identificació positiva de *C. m.* subsp. *sepedonicus* si els amplicons de PCR són de la mateixa mida i presenten polimorfismes del fragment de restricció amb la mateixa longitud que els de la soca de control positiu.

9.4. Prova FISH

a) Preparar una suspensió d'aproximadament 10⁶ cèl·lules per ml en aigua ultrapura.

b) Aplicar el procediment FISH (punt 5).

c) La prova FISH és positiva si s'obtenen les mateixes reaccions del cultiu i el control positiu.

9.5. Perfils d'àcids grassos (Fatty acid profiling o FAP)

a) Mantenir el cultiu en agar de tripticasa de soia (Oxoid) durant 72 hores a 21°C (+/- 1°).

b) Aplicar un procediment FAP adequat (Janse, 1991; Stead, 1992).

c) La prova FAP és positiva si el perfil del suposat cultiu és idèntic al del control positiu. Els àcids grassos la presència dels quals és característica són 15:1 anteiso A, 15:0 iso, 15:0 anteiso, 16:0 iso, 16:0 i 17:0. L'anteiso és altament indicatiu de *C. m. subsp. sepedonicus*. Altres gèneres, com ara *Curtobacterium*, *Arthrobacter* i *Micrococcus*, també tenen alguns d'aquests àcids. No obstant això, el 15:1 anteiso A és un àcid rar en aquests bacteris que, tanmateix, és present en totes les spp. *Clavibacter* en una proporció que oscil·la entre l'1 i el 5%. En *C. m. subsp. sepedonicus* el valor se situa normalment al voltant del 5%.

9.6. BOX-PCR

a) Preparar una suspensió d'aproximadament 10⁶ cèl·lules per ml en aigua ultrapura.

b) Aplicar la prova d'acord amb el procediment (Smith *et al.*, 2001).

10. PROVA DE CONFIRMACIÓ DE PATOGENICITAT

Com a confirmació final del diagnòstic de *C. m. subsp. sepedonicus* i per avaluar la virulència de cultius identificats com a *C. m. subsp. sepedonicus* s'ha de realitzar la prova de patogenicitat.

10.1. Preparar un inòcul d'aproximadament 10⁶ cèl·lules per ml de cultius de tres dies de l'aïllat que s'hagi de sotmetre a prova i d'una soca de control positiu adequada de *C. m. subsp. sepedonicus*.

10.2. Inocular entre 5 i 10 tiges de plàntules d'albergínia en la fase de la tercera fulla (punt 7.3. o 7.4).

10.3. Incubar a una temperatura de 18 a 24°C, amb llum suficient, humitat relativa alta i reg adequat, evitant tant l'estancament de l'aigua com l'estrès provocat per la sequera (punt 7.7) Amb els cultius purs s'ha d'obtenir el marciment típic en el termini de dues setmanes.

Transcorregut aquest termini, les plantes que no mostrin cap símptoma (vegeu el punt 7.8) s'han d'incubar durant un màxim de tres setmanes a temperatures que afavoreixin el seu creixement però que no superin els 25°C (apèndix 8). Si després de tres setmanes no es presenten els símptomes, no es pot confirmar que el cultiu és una forma patògena de *C. m. subsp. sepedonicus*.

10.4. Aïllar de les plantes simptomàtiques separant una secció de tija que estigui 2 cm per damunt de la secció d'inoculació. Dilacerar i suspendre en un petit volum d'aigua destil·lada estèril o en tampó fosfat 50 mm (apèndix 3). Aïllar de la suspensió mitjançant dilució, estenent o aplicant en estries en MTNA e YPGA (apèndix 5), incubar entre 3 i 5 dies a una temperatura de 21 a 23°C i examinar la formació de colònies típiques de *C. m. subsp. sepedonicus*.

Apèndix 1

Laboratoris dedicats a l'optimització i la validació dels protocols

| Laboratori (1) | Ciutat | País |
|---|--------------|---------------|
| Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit | Viena i Linz | Àustria |
| Departement Gewasbescherming | Merelbeke | Bèlgica |
| Plantdirektoratet | Lyngby | Dinamarca |
| Central Science Laboratory | York | Anglaterra |
| Scottish Agricultural Science Agency | Edimburg | Escòcia |
| Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité Bactériologie | Angers | França |
| Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre | Le Rheu | França |
| Biologische Bundesanstalt | Kleinmachnow | Alemanya |
| Pflanzenschutzamt Hannover | Hannover | Alemanya |
| State Laboratory | Irlanda | Dublín |
| Plantenziektenkundige Dienst | Wageningen | Països Baixos |
| Norwegian Crop Research Institute, Plant Protection Centre | Aas | Noruega |
| Direcção-Geral de Protecção das Culturas | Lisboa | Portugal |
| Nacionalni institut za biologijo | Ljubljana | Eslovènia |
| Centre de Diagnòstic d'Aldearrubia | Salamanca | Espanya |

(1) Científics de contacte: vegeu el lloc web

<http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

Apèndix 2

Preparació de controls positius i negatius per a les proves de selecció bàsiques PCR/IF i FISH

Preparar un cultiu de 72 hores d'una soca virulenta de *C. m. subsp. sepedonicus* [NCPBP 4053 o PD 406] en medi base MTNA i suspendre en tampó fosfat 10 mm per obtenir una concentració d'aproximadament 1 a 2×10^8 cfu per ml. Això s'obté normalment mitjançant una suspensió lleugerament tèrbola equivalent a una densitat òptica de 0,20 a 600 nm.

Separar les falques basals de 200 tubercles d'una varietat de pell blanca coneguda perquè està exempta de *C. m. subsp. sepedonicus*.

Processar les falques basals com sempre i resuspendre el precipitat en 10 ml.

Preparar 10 microvials estèrils d'1,5 ml amb 900 µl del precipitat resuspès.

Transferir 100 µl de la suspensió de *C. m. subsp. sepedonicus* al primer microvial. Homogeneïtzar per agitació.

Establir nivells decimals de contaminació realitzant noves dilucions en els cinc microvials següents.

Els sis microvials contaminats s'han d'utilitzar com a controls positius. Els quatre microvials no contaminats s'han d'utilitzar com a controls negatius. Etiquetar els microvials tal i com correspongui.

Preparar al·lòquies de 100 µl en microvials estèrils d'1,5 ml per obtenir d'aquesta manera nou rèpliques de cada mostra de control. Emmagatzemar a una temperatura de -16 a -24°C fins que es facin servir.

La presència i la quantificació de *C. m. subsp. sepedonicus* en les mostres de control s'ha de confirmar en primer lloc mitjançant una prova IF.

Per a la prova PCR, extreure ADN de les mostres de control positives i negatives per a cada sèrie de mostres d'assaig.

Per a les proves IF i FISH, realitzar assajos amb les mostres de control positives i negatives per a cada sèrie de mostres d'assaig.

En les proves IF, FISH i PCR, s'ha de detectar *C. m. subsp. sepedonicus* en almenys 10^6 i 10^4 cèl·lules/ml dels controls positius i en cap dels controls negatius.

Apèndix 3

Tampons per als mètodes de prova

GENERAL: els tampons esterilitzats es poden emmagatzemar sense obrir fins a un any.

1. Tampons per al procediment d'extracció

1.1. *Tampó d'extracció (tampó fosfat 50 mm, pH 7,0)*

Aquest tampó s'utilitza per extreure el bacteri del teixit de les plantes mitjançant homogeneïtzació o agitació.

| | |
|--|--------|
| Na ₂ HPO ₄ (anhidre) | 4,26 g |
| KH ₂ PO ₄ | 2,72 g |
| Aigua destil·lada | 1,00 l |

Dissoldre els ingredients, verificar el pH i esterilitzar en autoclau a 121°C durant 15 minuts.

Els components addicionals següents poden resultar útils:

| | Finalitat | Quantitat (per l) |
|---------------------------------------|-------------------------|-------------------|
| Flocs de lubrol | Defloculant (*) | 0,5 g |
| Compost DC silicona antiescumejant | Antiescumejant (*) | 1,0 ml |
| Pirofosfat tetrasòdic | Antioxidant | 1,0 g |
| Polivinilpirrolidona -40 000 (PVP-40) | Unir els inhibidors PCR | 50 g |

(*) Per utilitzar-lo en el mètode d'extracció per homogeneïtzació.

1.2. *Tampó d'extracció (tampó fosfat 10 mm, pH 7,2)*

Aquest tampó s'utilitza per a la resuspensió i la dilució d'extractes de falques basals de tubercles de patata després de la concentració en un precipitat mitjançant centrifugació.

| | |
|--|--------|
| Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O | 2,7 g |
| NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O | 0,4 g |
| Aigua destil·lada | 1,00 l |

Dissoldre els ingredients, verificar el pH i esterilitzar en autoclau a 121°C durant 15 minuts.

2. Tampons per a la prova IF

2.1. *Tampó IF [tampó fosfat salí (PBS) 10 mm, pH 7,2]*

Aquest tampó s'utilitza per a la dilució d'anticossos.

| | |
|--|--------|
| Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O | 2,7 g |
| NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O | 0,4 g |
| NaCl | 8,0 g |
| Aigua destil·lada | 1,00 l |

Dissoldre els ingredients, verificar el pH i esterilitzar en autoclau a 121°C durant 15 minuts.

2.2. *Tampó IF-Tween*

Aquest tampó s'utilitza per rentar els portaobjectes. Afegir Tween 20 al 0,1% al tampó IF.

2.3. *Solució de glicerol amb tampó fosfat, pH 7,6*

Aquest tampó s'utilitza com a fluid de muntatge en els vasos dels portaobjectes d'IF per augmentar la fluorescència.

| | |
|--|--------|
| Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O | 3,2 g |
| NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O | 0,15 g |
| Glicerol | 50 ml |
| Aigua destil·lada | 100 ml |

En el mercat es poden trobar solucions de muntatge que protegeixen la fluorescència, com per exemple, Vectashield® (Vector Laboratories) o Citifluor® (Leica).

Apèndix 4

Determinació del nivell de contaminació en les proves IF i FISH

1. Comptar el nombre de cèl·lules fluorescents típiques per camp de visió (c).

2. Calcular el nombre de cèl·lules fluorescents típiques per vaset del portaobjectes del microscopi (C).

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

en què

S = superfície del vaset del portaobjectes múltiple i

s = superfície del camp de l'objectiu

$$s = \pi i^2 / 4G^2K^2$$

en què

i = coeficient de camp (varia de 8 a 24 depenent del tipus ocular)

K = coeficient del tub (1 o 1,25)

G = augments de l'objectiu (100x, 40x, etc.)

3. Calcular el nombre de cèl·lules fluorescents típiques per ml de precipitat resuspès (N).

$$N = C \times 1.000/y \times F$$

en què

y = volum de precipitat resuspès en cada vaset i

F = factor de dilució del precipitat resuspès.

Apèndix 5

Medis per a l'aïllament i cultiu de *C. m. subsp. sepedonicus*

a) Medis de cultiu generals:

Agar nutritiu (NA)

| | |
|-----------------------|--------|
| Agar nutritiu (Difco) | 23,0 g |
| Aigua destil·lada | 1,00 l |

Dissoldre els ingredients i esterilitzar en autoclau a 121°C durant 15 minuts.

Agar de dextrosa nutritiu (NDA)

Agar nutritiu de Difcobacto amb un 1% de D(+)-glucosa (monohidrat). Esterilitzar en autoclau a 115°C durant 20 minuts.

Agar de llevat, peptona, glucosa (YPGA)

| | |
|----------------------------|--------|
| Extracte de llevat (Difco) | 5,0 g |
| Bactopeptona (Difco) | 5,0 g |
| D(+)-glucosa (monohidrat) | 10,0 g |
| Bactoagar (Difco) | 15,0 g |
| Aigua destil·lada | 1,00 l |

Dissoldre els ingredients i esterilitzar en autoclau a 121°C durant 15 minuts.

Medi de sals minerals, extracte de llevat (YGM)

| | |
|--------------------------------------|--------|
| Bactoextracte de llevat (Difco) | 2,0 g |
| D(+)-glucosa (monohidrat) | 2,5 g |
| K ₂ HPO ₄ | 0,25 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,25 g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,1 g |

| | |
|--------------------------------------|---------|
| MnSO ₄ ·H ₂ O | 0,015 g |
| NaCl | 0,05 g |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 0,005 g |
| Bactoagar (Difco) | 18 g |
| Aigua destil·lada | 1,00 l |

Dissoldre els ingredients i esterilitzar volums de mig litre d'aquest medi en autoclau a 115°C durant 20 minuts.

b) Medis de cultiu selectiu validats:

Medi MTNA

Llevat que s'especifiqui d'una altra manera, tots els components dels medis són de BDH.

| | |
|--------------------------------------|---------|
| Extracte de llevat (Difco) | 2,0 g |
| Manitol | 2,5 g |
| K ₂ HPO ₄ | 0,25 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,25 g |
| NaCl | 0,05 g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,1 g |
| MnSO ₄ ·H ₂ O | 0,015 g |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 0,005 g |
| Agar (oxid no 1) | 16,0 g |
| Aigua destil·lada | 1,0 l |

Dissoldre els ingredients i ajustar el pH a 7,2. Després d'esterilitzar en autoclau (a 121°C durant 15 minuts) i refredar a 50°C, afegir-hi els antibiòtics següents: 0,06 g de trimetoprim, 0,002 g d'àcid nalidíxic i 0,01 g de anfotericina B.

Solucions antibiòtiques estàndard: trimetoprim (Sigma) i àcid nalidíxic (Sigma) (en els dos casos a 5 mg/ml), en metanol al 96%, anfotericina B (Sigma) (1 mg/ml) en dimetil sulfòxid. Les solucions estàndard s'esterilitzen per filtració.

Nota: la durabilitat del medi base és de 3 mesos. Una vegada afegits els antibiòtics, la durabilitat és d'1 mes sempre que es mantinguin refrigerats.

Medi NCP-88

| | |
|--------------------------------------|--------|
| Agar nutritiu (Difco) | 23 g |
| Extracte de llevat (Difco) | 2 g |
| D-manitol | 5 g |
| K ₂ HPO ₄ | 2 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,5 g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,25 g |
| Aigua destil·lada | 1,0 l |

Dissoldre els ingredients i ajustar el pH a 7,2. Després d'esterilitzar en autoclau i refredar a 50°C, afegir-hi els antibiòtics següents: 0,003 g de sulfat de polimixina B (Sigma), 0,008 g d'àcid nalidíxic (Sigma) i 0,2 g de cicloheximida (Sigma).

Dissoldre els antibiòtics en les solucions estàndard següents: l'àcid nalidíxic en NaOH 0,01 M, la cicloheximida en etanol al 50% i el sulfat de polimixina B en aigua destil·lada. Les solucions estàndard s'esterilitzen per filtració.

Nota: la durabilitat del medi base és de 3 mesos. Una vegada afegits els antibiòtics, la durabilitat és d'1 mes sempre que es mantinguin refrigerats.

Apèndix 6

Reactius i protocol PCR validats

Nota: les proves preliminars han de permetre la detecció reproducible d'almenys 10^3 a 10^4 cèl·lules de *C. m. subsp. sepedonicus* per ml d'extracte de mostra.

Encebador directe PSA-1
Encebador revers PSA-R
Encebador directe NS-7-F
Encebador revers NS-8-R

D'altra banda, les proves preliminars no han de proporcionar resultats falsos positius respecte a un conjunt de soques bacterianes seleccionades.

1. Protocol PCR «multiplex» amb control PCR intern (Patrik, 2000)

1.1. Encebadors oligonucleòtids

5'- ctc ctt gtg ggg tgg gaa aa -3'
5'- tac tga gat gtt tca ctt ccc c -3'
5'- gag gca lliga aca ggt ctg tga tgc -3'
5'- tcc gca ggt tca cct acg ga -3'

Mida esperada de l'amplicó d'ADN de *C. m. subsp. sepedonicus* = 502 pb (conjunt d'encebadors PSA).

Mida esperada de l'amplicó del control PCR intern d'ARNr 18S = 377 pb (conjunt d'encebadors NS).

1.2. Mescla per a la reacció PCR

| Reactiu | Quantitat per a la reacció | Concentració final |
|--|----------------------------|--------------------------------|
| Aigua ultrapura estèril | 15,725 µl | |
| 10x tampó PCR (1) (15 mm MgCl ₂) | 2,5 µl | 1x (1,5 mm MgCl ₂) |
| BSA (fracció V) (10%) | 0,25 µl | 0,1% |
| Mescla d-nTP (20 mm) | 0,125 µl | 0,1 mm |
| Encebador PSA-1 (10µM) | 0,5 µl | 0,2 µM |
| Encebador PSA-R (10µM) | 0,5 µl | 0,2 µM |
| Encebador NS-7-F (10µM) (2) | 0,1 µl | 0,04 µM |
| Encebador NS-8-R (10µM) (2) | 0,1 µl | 0,04 µM |
| Polimerasa Taq (5U/µl) (1) | 0,2 µl | 1,0 U |
| Volum de mostra | 5,0 µl | |
| Volum total: | 25,0 µl | |

(1) Els mètodes es van validar utilitzant polimerasa Taq de Perkin Elmer (AmpliAq o Gold) i Gibco BRL.

(2) La concentració dels encebadors NS-7 F i NS-8-R es va optimitzar per a l'extracció de falques basals de patata utilitzant el mètode d'homogeneïtzació i purificació de l'ADN d'acord amb Patrik (2000) (vegeu els punts 6.1.a) i 6.2). És necessari procedir a fer la reoptimització de les concentracions de reactius si s'utilitza el mètode d'extracció per agitació o altres mètodes d'aïllament de l'ADN.

1.3. Condicions de reacció PCR

Aplicar el programa següent:

1 cicle de:

i) 3 minuts a 95°C (desnaturalització d'ADN)

10 cicles de:

ii) 1 minut a 95°C (desnaturalització d'ADN)

iii) 1 minut a 64°C (anellament dels encebadors)

iv) 1 minut a 72°C (extensió de la còpia)

25 cicles de:

v) 30 segons a 95°C (desnaturalització d'ADN)

vi) 30 segons a 62°C (anellament dels encebadors)

vii) 1 minut a 72°C (extensió de la còpia)

1 cicle de:

viii) 5 minuts a 72°C (extensió final)

ix) mantenir a 4°C

Nota: aquest programa s'ha optimitzat per utilitzar-lo amb un termociclador MJ Research PTC 200. Pot ser necessari modificar la durada dels cicles ii), iii) iv), v), vi) i vii) per utilitzar-lo amb altres models.

1.4. Anàlisi de l'enzim de restricció de l'amplicó

Els productes PCR amplificats a partir d'ADN de *C. m. subsp. sepedonicus* produeixen un polimorfisme de la longitud del fragment de restricció característic amb l'enzim *Bgl* II després de la incubació a 37°C durant 30 minuts. Les mides dels fragments de restricció obtinguts a partir del fragment específic de *C. m. subsp. sepedonicus* són de 282 pb i 220 pb.

2. Preparació del tampó de càrrega

2.1. Blau de bromofenol (solució estàndard al 10%)

Blau de bromofenol 5 g
Aigua bidestilada 50 ml

2.2. Tampó de càrrega

Glicerol (86%) 3,5 ml
Blau de bromofenol (2.1.) 300 µl
Aigua bidestilada 6,2 ml

3. 10X tampó de tris acetat EDTA (TAE), pH 8,0

Tampó tris 48,4 g
Àcid acètic glacial 11,42 ml
EDTA (sal disòdica) 3,72 g
Aigua destil·lada 1,00 l

Diluir a 1X abans d'utilitzar-lo.

També està disponible en el mercat (per exemple, Invitrogen o equivalent).

Apèndix 7

Reactius validats per a la prova FISH

1. Oligosondes

Sonda específica per a *Cms* CMS-CY3-01:

5'- ttg cgg ggc gca cat ctc tgc acg -3'

Sonda eubacteriana no específica EUB-338-FITC:

5'- gct gcc tcc cgt agg agt-3'

2. Solució fixadora

[ADVERTÈNCIA: LA SOLUCIÓ FIXADORA CONTÉ PARAFORMALDEHID QUE ÉS TÒXIC. UTILITZAR GUANTS I NO INHALAR. ES RECOMANA TREBALLAR EN UNA CAMPANA EXTRACTORA DE GASOS.]

i) Escalfar 9 ml d'aigua de grau molecular (per exemple, aigua ultrapura) a 60°C aproximadament i afegir-hi 0,4 g de paraformaldehid. El paraformaldehid es dissol quan s'hi afegeixen cinc gotes de NaOH 1N i es remou amb un agitador magnètic.

ii) Ajustar el pH a 7,0 mitjançant l'addició d'1 ml de tampó fosfat de concentració 0,1 M (pH 7,0) i 5 gotes de HCl 1N. Verificar el pH amb bandes indicadores i ajustar si és necessari amb HCl o NaOH.

[ADVERTÈNCIA: NO UTILITZAR UN MESURADOR DE PH EN SOLUCIONS QUE CONTINGUIN PARAFORMALDEHID.]

iii) Filtrar la solució amb un filtre de membrana de 0,22 µm i mantenir lliure de pols a 4°C fins a una nova utilització.

iv) Nota: solució fixadora alternativa: etanol al 96%.

3. 3X HybMix

NaCl 2,7 M

Tris-HCl 60 mM (pH 7,4)

EDTA (esterilitzat per filtració i autoclau) 15 mM

Diluir a 1X quan sigui necessari.

4. Solució d'hibridació

1X HybMix

Dodecilsulfat sòdic (SDS) 0,01%

sonda EUB 338 5 ng/µl

sonda CMSCY301 5 ng/µl

Preparar les quantitats de solució d'hibridació d'acord amb els càlculs de la taula 1. Per a cada portaobjectes (que contingui dues mostres diferents per duplicat) es necessiten 90 µl de solució d'hibridació.

Taula 1: Quantitats suggerides per preparar la mescla d'hibridació.

| | 2 portaobjectes | 8 portaobjectes |
|-------------------------|--------------------|--------------------|
| Aigua ultrapura estèril | 50,1 | 200,4 |
| 3x HybMix | 30,0 | 120,0 |

| | 2 portaobjectes | 8 portaobjectes |
|----------------------------|--------------------|--------------------|
| 1% SDS | 0,9 | 3,6 |
| Sonda EUB 338 (100 ng/µl) | 4,5 | 18,0 |
| Sonda CMSCY301 (100 ng/µl) | 4,5 | 18,0 |
| Volum total (µl) | 90,0 | 360,0 |

N. B.: emmagatzemar totes les solucions que continguin oligosondes fotosensibles en la foscor a -20°C. Protegir de la llum directa ja sigui del sol o elèctrica durant la seva utilització.

5. Tampó fosfat 0,1 M, pH 7,0

Na₂HPO₄ 8,52 g

KH₂PO₄ 5,44 g

Aigua destil·lada 1,00 l

Dissoldre els ingredients, verificar el pH i esterilitzar en autoclau a 121°C durant 15 minuts.

Apèndix 8

Cultiu d'albergínies

Semrar llavors d'albergínia (*Solanum melongena*) en compost pasteuritzat de llavors. Trasplantar les plàntules amb els cotilèdons completament oberts (1 a 14 dies) en compost pasteuritzat de test.

Les albergínies s'han de cultivar en un hivernacle que compleixi les condicions ambientals següents:

Durada diürna: 14 hores o dia natural si és de més durada

Temperatura:

diürna: de 21 a 24°C

nocturna: 15°C

Varietats d'albergínia sensibles:

'Black Beauty',

'Long Tom',

'Rima',

'Balsas'.

Proveïdors:

vegeu el lloc web

<http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

Apèndix 9

Procediment de la tinció de Gram (modificació de Hucker) (Doetsch, 1981) (1)

Solució de cristall violeta

Dissoldre 2 g de cristall violeta en 20 ml d'etanol al 95%.

Dissoldre 0,8 g d'oxalat amònic en 80 ml d'aigua destil·lada.

Mesclar les dues solucions.

Solució de lugol

Iode 1 g

Iodur de potassi 2 g

Aigua destil·lada 300 ml

Triturar conjuntament els sòlids en un morter. Afegir-los a l'aigua i remoure fins que es dissolguin en un recipient tancat.

Solució de contrast de safranina

Solució estàndard:

| | |
|---------------|--------|
| Safranina O | 2,5 g |
| Etanol al 95% | 100 ml |

Mesclar i conservar.

Diluir a l'1:10 per aconseguir una solució de treball.

Procediment de tinció

1. Preparar els frotis, assecat a l'aire i fixar per calor.
2. Submergir el portaobjectes en la solució de cristall violeta durant un minut.
3. Rentar breument amb aigua corrent.
4. Submergir en solució de lugol durant un minut.
5. Rentar amb aigua corrent i assecat.
6. Decolorar amb etanol al 95%, afegit gota a gota fins que ja no es produeixi cap canvi de color, o submergir agitant suaument durant 30 segons.
7. Rentar amb aigua corrent i assecat.
8. Submergir en la solució de safranina durant 10 segons.
9. Rentar amb aigua corrent i assecat.

Els bacteris grampositius es tenyeixen de violeta-blau i els gramnegatius de rosa-vermell.

(1) També es poden utilitzar altres solucions i jocs de tinció disponibles en el mercat.

BIBLIOGRAFIA

1. Anònim, 1987, «Scheme of the detection and diagnosis of the ring rot bacterium *Corynebacterium sepedonicum* in batches of potato tubers». Comissió de les Comunitats Europees, Luxemburg. Publ EUR 11 288 EN, 21 pp.
2. Bradbury, J. F., 1970, «Isolation and preliminary study of bacteria from plants», *Rev. Pl. Path.*, 49, pp. 213-218.
3. Dinesen, I. G., 1984, «The extraction and diagnosis of *Corynebacterium sepedonicum* from diseased potato tubers», *EPPO Bull.* 14 (2), pp. 147-152.
4. Doetsch, R. N., 1981, «Determinative methods of light microscopy», *Manual of methods for general bacteriology, American Society for Microbiology*. Washington, pp. 21-23.
5. Hugh, R. F. Leifson, 1953, «The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria», *J. Bact.*, 66, pp. 24-26.
6. Janse, J. D., 1991, «Infra- and intra-specific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty acid analysis», *Systematic and Applied Microbiology* 14, pp. 335-345.
7. Janse, J. D. i J. Van Vaerenbergh, «The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (*Corynebacterium sepedonicum*) in potato», *EPPO Bull.*, 17, 1987, pp. 1-10.
8. Jansing, H. i K. Rudolph, 1998, «Physiological capabilities of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* and development of a semi-selective medium», *Journal of Plant Diseases and Protection*, 105, pp. 590-601.
9. Klement Z.; Rudolph, K i D. C. Sands, 1990. *Methods in Phytobacteriology*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 pp.
10. Kovacs, N., 1956, «Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction», *Nature*, Londres, 178, pp. 703
11. Lelliott, R. A., 1966, «The plant pathogenic coryneform bacteria», *J. appl. Bact.*, 29, pp. 114-118.
12. Lelliott, R. A., E. Billing i A. C. Hayward, 1966, «A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads», *J. appl. Bact.*, 29, pp. 470-489.
13. Lelliott, R. A. i P. W. Segellar, 1976, «The detection of latent ring rot [*Corynebacterium sepedonicum* (Spiek. et Kotth.) Skapt. et Burkh.] in potato stocks», *EPPO Bull.*, 6 (2), pp. 101-106.
14. Lelliott, R.A. and Stead, D.E. 1987. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. Blackwell scientific Publications Ltd., Oxford. 216 pp.
15. Li, X. i S.H. de Boer, 1995, «Selection of Polymerase Chain Reaction primers from RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*», *Phytopathology*, 85, pp. 837-842.
16. Mills, D., Russell, B., W. i J., W. Hanus, 1997, «Specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* by amplification of three unique DNA sequences isolated by subtraction hybridization», *Phytopathology*, 87, 8, pp. 853-861.
17. Pastrik, K. -H. i R.A. Rainey. 1999, «Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques», *J. Phytopathology* 147; pp. 687-693.
18. Pastrik, K.-H., 2000, «Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA», *European Journal of Plant Pathology*, 106, pp. 155-165.
19. Ramamurthi, C. S., 1959, «Comparative studies on some Gram-positive phytopathogenic bacteria and their relationship to the Corynebacteria», *Mem. Cornell agric. Exp. Sta.*, 366, 52 pp.
20. Schaad, W., Berthier-Schaad, I., Sechler, A. i Knorr, D. (1999), «Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system», *Plant Disease* 83; pp. 1095-1100.
21. Schaad, W. 2001, «Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria», *Schaad* [Hrsg.]. 3a. ed.; St. Paul, Minnesota, 373 pp.
22. Skerman, V. B. D., 1967, *A guide to the identification of the genera of bacteria*. Segona edició, Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1967.
23. Smith, N. C.; Hennesy, J.; Stead, D.E., 2001, «Repetitive sequence-derived PCR profiling using the BOX-A1 *Ralstonia solanacearum* primer for rapid identification of plant pathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*», *European Journal of Plant Pathology*, 107 (7), pp. 739-748.
24. Sneath, P. H. A. i V. G. Collins, 1974, «A study in test reproductibility between laboratories:

report of *Pseudomonas* working party», *Antonie van Leeuwenhoek*, 40, pp. 481-527.

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

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

ANNEX II

Conservació de les proves analítiques en cas d'aparició d'un brot sospitós

1. En cada cas de focus sospitós per al qual s'hagin realitzat una o diverses proves de selecció amb resultats positius d'acord amb els mètodes que estableix l'annex I, i s'espera rebre confirmació o refutació per aplicació d'aquests mètodes, s'ha de procedir a fer-ne la retenció i adequada conservació de:

- tots els tubercles i, sempre que sigui possible, les plantes dels tubercles de què s'hagin obtingut mostres,
- qualsevol extracte sobrant i qualsevol material addicional que s'hagi preparat per a la prova o proves de selecció (per exemple, les plaques d'immunofluorescència),

i

- tota la documentació pertinent, fins a completar l'aplicació dels mètodes damunt esmentats.

La retenció dels tubercles permet que es puguin portar a terme proves de varietats quan es consideri oportú.

2. En el cas de confirmació de la presència de l'organisme, s'ha de procedir a fer-ne la retenció i adequada conservació:

- del material que especifica el punt 1,
- d'una mostra de les albergínies infectades inoculades amb extracte de tubercle o de planta,

i

- del cultiu aïllat de l'organisme,

fins a un mes després, com a mínim, en virtut del procediment que estableix l'article 5, apartat 2.

ANNEX III

Elements que s'han de tenir en compte per determinar la població contaminant

1. Els elements que s'han de tenir en compte per determinar l'extensió de la probable contaminació d'acord amb l'article 5, apartat 1, lletra b), inclouen:

- els tubercles o plantes cultivats en un lloc de producció declarat contaminat en virtut de l'article 5, apartat 1, lletra a);

- el lloc o els llocs de producció relacionats d'alguna manera amb la producció dels tubercles o plantes declarats contaminats en virtut de l'article 5, apartat 1, lletra a), inclosos el material i les instal·lacions de producció compartits directament o a través d'un contractista comú;

- els tubercles o plantes produïts en el lloc o els llocs de producció que preveu el guió anterior, o presents en aquest lloc o aquests llocs de producció durant el període en què els tubercles o les plantes declarats contaminats segons l'article 5, apartat 1, lletra a), es trobaven en el lloc de producció esmentat en el primer guió;

- els locals que manipulin patates procedents dels llocs de producció esmentats en els guions anteriors;

- qualsevol maquinària, vehicle, vaixell, magatzem o les seves unitats i qualsevol altres objectes, inclòs el material d'embalatge, que puguin haver estat en contacte amb els tubercles o plantes declarats contaminats en virtut de l'article 5, apartat 1, lletra a);

- tots els tubercles o plantes emmagatzemats o que hagin estat en contacte amb qualsevol de les estructures o objectes enumerats en el guió anterior abans de netejar-los i desinfectar-los; com a resultat de les proves que preveu l'article 6, els tubercles o plantes que tinguin una relació clonal fraterna o paternal amb els tubercles o plantes declarats contaminats en virtut de l'article 5, apartat 1, lletra a), i respecte als quals sembli probable la contaminació a través d'un vincle clonal, encara que les proves de detecció de l'organisme hagin donat resultats negatius; es poden portar a terme proves de varietats per verificar la identitat dels tubercles o plantes contaminats i clonalment relacionats,

i

- el lloc o els llocs de producció dels tubercles o plantes als quals fa referència el guió anterior.

2. Els elements que s'han de tenir en compte per determinar la possible propagació d'acord amb l'article 5, apartat 1, lletra c), han d'incloure:

- la proximitat d'altres llocs de producció en els quals es cultivin patates o altres plantes hostes, i
- la producció en comú i l'ús comú d'existències de patates de sembra.

3. La notificació a què fa referència l'article 5, apartat 2, s'ha d'ajustar al següent:

- s'ha d'efectuar de manera immediata una vegada que la presència hagi estat confirmada per les proves de laboratori d'acord amb els mètodes exposats en l'annex I, i ha de recollir, com a mínim:

- el nom de la varietat del lot de patates,
- el tipus (de consum, de sembra, etc.) i, si s'escau, la categoria de patata de sembra,

— quan hi hagi el risc de contaminació de patates procedents d'una altra o altres comunitats autònomes, la comunitat autònoma en què s'hagi confirmat el brot ha de notificar immediatament a les comunitats autònomes interessades la informació necessària per declarar, si s'escau, la contaminació, determinar l'extensió de la probable contaminació i delimitar una zona de conformitat amb les lletres a), b), i c) de l'apartat 1 de l'article 5, incloent-hi:

- el nom de la varietat del lot de patates,
- el nom i l'adreça del proveïdor i del destinatari,
- la data de lliurament del lot de patates,
- la mida del lot de patates lliurat,
- una còpia del passaport fitosanitari o almenys el número d'aquest passaport, si s'escau, o el número de registre del cultivador o del comerciant, si s'escau, i una còpia de l'avís de lliurament.

Quan se subministri aquesta informació, la comunitat autònoma n'ha d'informar immediatament el Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació.

— quan hi hagi el risc de contaminació de patates destinades a un altre o altres estats membres, la comunitat autònoma en què s'hagi confirmat el brot ha de notificar immediatament al Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació i aquest Ministeri al seu torn, a través de la via corresponent, als estats membres interessats, la informació necessària per declarar, si s'escau, la contaminació i delimitar una zona de conformitat amb les lletres a), b), i c) de l'apartat 1 de l'article 5, i s'hi han d'incloure:

- el nom de la varietat del lot de patates,
- el nom i l'adreça del proveïdor i del destinatari,
- la data de lliurament del lot de patates,
- la mida del lot de patates lliurat,
- una còpia del passaport fitosanitari o almenys el número d'aquest passaport, si s'escau, o el número de registre del cultivador o del comerciant, si s'escau, i una còpia de l'avís de lliurament.

Quan se subministri aquesta informació, el Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació n'ha d'informar immediatament la Comissió.

— quan hi hagi el risc de contaminació de patates procedents d'un altre o altres estats membres arran de la corresponent notificació o notificacions d'aquests, el Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació ha de comunicar la informació rebuda a les comunitats autònomes interessades per declarar, si s'escau, la contaminació, determinar l'extensió de la probable contaminació i delimitar una zona d'acord amb les lletres a), b), i c) de l'apartat 1 de l'article 5.

— Una vegada que totes les investigacions hagin conclòs, les comunitats autònomes han de facilitar, per a cada cas:

- la data en què es va confirmar la contaminació,

- una breu descripció de la investigació portada a terme per identificar la font i la possible propagació de la contaminació, inclòs l'abast del mostratge efectuat,

- informació sobre la font o les fonts de contaminació determinades o presumptes,

- detalls relatius a l'extensió de la contaminació declarada, inclosos el nombre de llocs de producció i el nombre de lots, amb la indicació de la varietat i, en el cas de la patates de sembra, la categoria,

- detalls relatius a la delimitació de la zona, inclòs el nombre de llocs de producció no declarats contaminats però inclosos en la zona,

- qualsevol altres dades que requereixi el Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació o, si s'escau, la Comissió relatius al brot o als brots confirmats.

ANNEX IV

Mesures sota control oficial

1. Les mesures sota control oficial que preveu l'article 7, lletra a), són les següents:

— la utilització com a pinsos després d'un tractament tèrmic adequat que garanteixi que no hi ha cap risc de supervivència de l'organisme,

o bé

— l'eliminació en un abocador autoritzat oficialment amb aquesta finalitat on no s'hagi pogut determinar cap risc d'escapament del patogen al medi ambient, per exemple, mitjançant la filtració a terres de cultiu,

o bé

— la incineració,

o bé

— la transformació industrial mitjançant lliurament directe i immediat a una planta de transformació dotada d'instal·lacions d'eliminació de residus autoritzades oficialment, respecte a les quals s'hagi exclòs qualsevol risc identificable de propagació de l'organisme, i d'un sistema de neteja i desinfecció dels vehicles de transport, com a mínim,

o bé

— altres mesures, sempre que s'hagi descartat el possible risc de propagació de l'organisme, les quals s'han de notificar al Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació i aquest Ministeri al seu torn, a través de la via corresponent, a la Comissió i als altres estats membres, acompanyades de la seva justificació.

Qualsevol residu restant associat i derivat de l'anterior s'ha d'eliminar mitjançant mètodes autoritzats oficialment d'acord amb el que disposa l'annex V de la present Ordre.

2. La utilització o l'eliminació apropiades dels tubercles o les plantes declarades probablement contaminades de conformitat amb l'article 5, apartat 1, lletra b), a les quals fa referència l'article 7, lletra b), s'han d'efectuar sota el control dels organismes oficials

responsables interessats, així com amb l'oportuna comunicació entre aquests organismes per garantir en tot moment aquest control, i amb l'aprovació de l'organisme oficial responsable de la comunitat autònoma on les patates s'hagin d'envasar o transformar, pel que fa als abocadors esmentats en els guions primer i segon, i consisteixen en el següent:

- la utilització com a patates de consum destinades al consum, envasades per distribuir-les i vendre-les sense canvi d'envàs, en un lloc dotat d'instal·lacions d'eliminació de residus adequades; les patates destinades a la sembra només es poden manipular en el mateix lloc si això es realitza separatament o després de la neteja i desinfecció,

o

- el seu ús com a patates de consum per a la transformació industrial i destinades al lliurament directe i immediat a una planta de transformació dotada d'instal·lacions adequades d'eliminació de residus i d'un sistema de neteja i desinfecció d'almenys els vehicles de transport,

o

- algun altre tipus d'ús o eliminació, sempre que s'exclouï qualsevol risc identificable de propagació de l'organisme, i amb l'aprovació prèvia dels esmentats organismes oficials responsables.

3. Els mètodes apropiats de neteja i desinfecció de tots els objectes que preveu l'article 7, lletra c), són aquells per als quals s'hagi exclòs qualsevol risc identificable de propagació de l'organisme, i s'han d'aplicar sota el control dels organismes oficials responsables de les comunitats autònomes.

4. La sèrie de mesures que han d'adoptar les comunitats autònomes en la zona delimitada de conformitat amb l'article 5, apartat 1, lletra c), a la qual fa referència l'article 7, lletra d), ha d'incloure les mesures següents:

4.1. En els llocs de producció que es declarin contaminats en virtut de l'article 5, apartat 1, lletra a):

- a) en els camps que es declarin contaminats segons l'article 5, apartat 1, lletra a), o bé,

- i) — almenys durant els tres anys de cultiu següents al de declaració de la contaminació:

- s'han d'adoptar mesures per eliminar les plantes de patata espontànies i altres plantes que puguin contenir naturalment l'organisme,

i

- no s'han de plantar tubercles, plantes ni llavors de patata pròpiament dites, ni cap altra planta que pugui contenir naturalment l'organisme, ni cap cultiu que presenti un risc cert de propagació de l'organisme,

- en la primera temporada de cultiu de patates següent al període que indica el guió anterior i, sempre que en les inspeccions oficials s'hagi comprovat que, durant almenys els dos anys de vegetació immediatament anteriors a la plantació, el camp va estar lliure de plantes de patata espontànies i altres plantes que puguin contenir naturalment l'organisme, només

s'ha de permetre la producció de patates de consum i els tubercles recol·lectats s'han de sotmetre a prova d'acord amb el procediment que detalla l'annex I,

- en la temporada de cultiu de patates següent a l'esmentada en el guió anterior i després d'un cicle de rotació adequat, la durada mínima del qual ha de ser de dos anys quan s'hagin de cultivar patates de sembra, es poden plantar patates de sembra o de consum i s'ha de realitzar una enquesta oficial tal i com disposa l'article 2, apartat 1, o bé,

- ii) — durant els quatre anys de cultiu següents al de declaració de la contaminació:

- s'han d'adoptar mesures per eliminar les plantes de patata espontànies i altres plantes que puguin contenir naturalment l'organisme,

• i

- s'ha de deixar i mantenir el camp, o bé en guaret complet, o bé en pastura permanent amb segada o pasturatge intens o freqüent,

- en la primera temporada de cultiu de patates següent al període indicat en el guió anterior i, sempre que en les inspeccions oficials s'hagi comprovat que, durant almenys els dos anys de vegetació immediatament anteriors a la plantació, el camp va estar lliure de plantes de patata espontànies i altres plantes que puguin contenir naturalment l'organisme, s'ha de permetre la producció de patates de sembra o consum i els tubercles recol·lectats s'han de sotmetre a prova d'acord amb el procediment que detalla l'annex I;

- b) en la resta dels camps del lloc de producció contaminat, i amb la condició que els organismes oficials competents tinguin la certesa que s'ha eliminat el risc de plantes de patata espontànies i de qualsevol altra planta que pugui contenir naturalment l'organisme:

- durant l'any de cultiu següent al de declaració de contaminació o bé no s'hi planten tubercles, plantes ni llavors pròpiament dites de patata, ni qualsevol altra planta que pugui contenir naturalment l'organisme, o s'hi poden plantar patates de sembra certificades, però només per a la producció de patates de consum, i

- durant el segon any de cultiu següent al de declaració de contaminació només es poden plantar patates de sembra certificades o patates de sembra que hagin estat sotmeses a proves oficials per determinar l'absència de necrosi bacteriana i cultivades sota control oficial en llocs de producció diferents dels que figuren en el punt 4.1, ja sigui per a la producció de sembra o de consum,

- durant el tercer any de cultiu següent al de declaració de contaminació, com a mínim, només es poden plantar patates de sembra certificades o patates de sembra cultivades sota control oficial a partir de patates de sembra certificades, ja sigui per a la producció de sembra o de consum,

- en cadascun dels anys de cultiu esmentats en els guions anteriors, s'han de prendre mesures per eliminar les plantes de patata espontànies i qualsevol

altra planta que pugui contenir naturalment l'organisme en cas d'advertir-se'n la presència, i s'han de realitzar proves oficials de les patates recol·lectades d'acord amb el procediment que detalla l'annex I en tots els camps de patates;

c) immediatament després de la declaració de contaminació en virtut de l'article 5, apartat 1, lletra a), i després del primer any de cultiu següent, totes les màquines i instal·lacions d'emmagatzematge que estiguin en el lloc de producció i intervinguin en la producció de patates s'han de netejar i desinfectar tal i com resulti adequat amb els mètodes apropiats, segons el que disposa el punt 3;

d) en el cas de les unitats de producció de cultius protegits en les quals sigui possible una substitució total dels medis de cultiu,

— no s'han de plantar tubercles, plantes ni llavors pròpiament dites fins que la unitat de producció no hagi estat sotmesa a mesures sota control oficial destinades a eliminar l'organisme i a retirar tot el material vegetal que en pugui ser hoste, inclosa, com a mínim, la substitució total del medi de cultiu i la neteja i desinfecció de la unitat de producció i de tots els equips, i els organismes oficials responsables no hagin concedit la subsegüent autorització per a la producció de patata,

i

— la producció de patata ha de procedir de patates de sembra certificades o de minitubercles o microplantes derivades de fonts provades.

4.2. Dins de la zona delimitada, sense perjudici del que disposa el punt 4.1, les comunitats autònomes han d'aplicar les mesures següents:

a) immediatament després de la declaració de contaminació, han de vetllar perquè tota la maquinària i les instal·lacions d'emmagatzematge de l'explotació que hagin intervingut en la producció de patates es netegin i desinfectin tal i com sigui adequat i amb els mètodes apropiats, segons el que disposa el punt 3,

b) immediatament i durant almenys tres temporades de cultiu després de la declaració de contaminació:

— han de controlar a través dels seus organismes oficials responsables les explotacions que cultivin, emmagatzemin o manipulin tubercles de patata, a més de les explotacions que contractin màquines per a aquest cultiu,

— han de requerir que, per a tots els cultius de patata dins de la zona delimitada, es plantin exclusivament llavors certificades o llavors cultivades sota control oficial, i s'efectuï una anàlisi després de recol·lectar els cultius de patates de sembra en llocs de producció declarats probablement contaminats segons l'article 5, apartat 1, lletra b),

— han d'exigir que es manipulin per separat les existències de patates de sembra i de patates de consum recol·lectades en totes les explotacions de la zona, o que s'estableixi un sistema de neteja i desinfecció entre

el maneig de les existències de patates de sembra i el de les de consum.

— han de portar a terme una enquesta oficial segons el que disposa l'article 2, apartat 1;

c) han d'establir un programa, segons correspongui, per substituir totes les existències de patates de sembra per un període de temps convenient.

ANNEX V

Mètodes oficialment autoritzats per eliminar residus

Els mètodes oficialment autoritzats per eliminar residus que figuren en el punt 1 de l'annex IV s'han d'ajustar a les disposicions següents, de manera que s'exclouin tots els riscos identificables de propagació de l'organisme:

i) Els residus de patata (incloses les patates descartades i les peles) i qualsevol altre residu sòlid associat a les patates (inclosa la terra, les pedres i altres restes) s'han d'eliminar d'una de les següents maneres:

— en un abocador autoritzat oficialment amb aquesta finalitat on no s'hagi pogut determinar cap risc d'escapament de l'organisme al medi ambient, per exemple, mitjançant la filtració a terres de cultiu; els residus s'han de traslladar directament a l'abocador en unes condicions de confinament que impedeixin qualsevol risc de perdre'ls,

— s'han d'incinerar,

o

— s'han de sotmetre a altres mesures, sempre que es descarti el possible risc de propagació de l'organisme; aquestes mesures s'han de notificar immediatament al Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació i aquest Ministeri, al seu torn, a través de la via corresponent, a la Comissió i als altres estats membres.

ii) Els residus líquids que continguin elements sòlids en suspensió s'han de filtrar o s'han de sotmetre a processos de sedimentació per separar els elements esmentats; aquests s'han d'eliminar de la manera que disposa l'incís i).

A continuació, els residus líquids s'han de sotmetre a alguna de les mesures següents:

— s'han d'escalfar a un mínim de 60°C en tot el seu volum durant 30 minuts almenys abans de l'eliminació,

o

— s'han d'eliminar per un altre sistema que, aprovat oficialment i aplicat sota control oficial, descarti qualsevol risc identificable de contacte dels residus amb terres de cultiu. Les característiques d'aquest sistema s'han de notificar al Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació i aquest Ministeri, al seu torn, a través de la via corresponent, als altres estats membres i a la Comissió.

Les opcions descrites en el present annex també s'apliquen als residus associats a la manipulació, l'eliminació i el tractament de lots contaminats.»