

Trattandosi di un semplice strumento di documentazione, esso non impegna la responsabilità delle istituzioni

► **B**

DIRETTIVA 93/85/CEE DEL CONSIGLIO

del 4 ottobre 1993

concernente la lotta contro il marciume anulare della patata

(GU L 259 del 18.10.1993, pag. 1)

Modificata da:

	Gazzetta ufficiale		
	n.	pag.	data
► M1 Direttiva 2006/56/CE della Commissione del 12 giugno 2006	L 182	1	4.7.2006



DIRETTIVA 93/85/CEE DEL CONSIGLIO

del 4 ottobre 1993

concernente la lotta contro il marciume anulare della patata

IL CONSIGLIO DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità economica europea, in particolare l'articolo 43,

vista la proposta della Commissione ⁽¹⁾,

visto il parere del Parlamento europeo ⁽²⁾,

visto il parere del Comitato economico e sociale ⁽³⁾,

considerando che la produzione di patate occupa un posto importante nell'agricoltura della Comunità; che la resa di tale produzione è costantemente minacciata da organismi nocivi;

considerando che la protezione della coltivazione della patata contro tali organismi nocivi è necessaria non solo per mantenere intatta la resa, ma anche per aumentare la produttività dell'agricoltura;

considerando che le misure protettive contro l'introduzione di organismi nocivi nel territorio di uno Stato membro avrebbero efficacia limitata se detti organismi non venissero combattuti simultaneamente e metodicamente in tutta la Comunità e se non se ne prevenisse la disseminazione;

considerando che uno degli organismi nocivi per la patata è il «*Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al.», agente causale della malattia batterica denominata «marciume anulare della patata»; che questa malattia si è manifestata in una parte della Comunità e che sussistono ancora alcuni focolai d'infezione di scarsa entità;

considerando che in tutto il territorio della Comunità la coltivazione della patata è esposta ad un serio pericolo, se non si effettuano interventi efficaci per localizzare questa malattia, determinarne lo stato di diffusione, prevenirne l'insorgenza e la disseminazione e, qualora fosse constatata, impedirne la disseminazione e combatterla ai fini della sua eradicazione;

considerando che, per conseguire tale scopo, occorre adottare determinati criteri di lotta per la Comunità; che gli Stati membri devono inoltre avere la possibilità di adottare misure supplementari o più rigorose, qualora risultino necessarie e purché non vengano creati ostacoli alla circolazione delle patate nella Comunità, fatte salve le disposizioni della direttiva 77/93/CEE del Consiglio, del 21 dicembre 1976, concernente le misure di protezione contro l'introduzione nella Comunità di organismi nocivi ai vegetali o ai prodotti vegetali e contro la loro diffusione nella Comunità ⁽⁴⁾; che tali criteri devono essere notificati agli altri Stati membri e alla Commissione;

considerando che la direttiva 80/665/CEE del Consiglio, del 24 giugno 1980, concernente la lotta contro il marciume anulare della patata ⁽⁵⁾ prescrive agli Stati membri di adottare criteri minimi di lotta contro tale malattia;

considerando che, da allora, si sono acquisite importanti conoscenze sul marciume anulare della patata e sull'individuazione dell'infezione trasmessa da tale malattia;

considerando che l'applicazione del regime fitosanitario della Comunità in un'area senza frontiere interne comporta il riesame e la modifica di talune disposizioni della direttiva 80/665/CEE;

⁽¹⁾ GU n. C 93 del 2. 4. 1993, pag. 12.

⁽²⁾ GU n. C 176 del 28. 6. 1993, pag. 210.

⁽³⁾ GU n. C 161 del 14. 6. 1993, pag. 18.

⁽⁴⁾ GU n. L 26 del 31. 1. 1977, pag. 20. Direttiva modificata da ultimo dalla direttiva 92/103/CEE della Commissione (GU n. L 363 dell'11. 12. 1992, pag. 1).

⁽⁵⁾ GU n. L 180 del 14. 7. 1980, pag. 30.

▼B

considerando che, in seguito a tali esami, alcune disposizioni della direttiva 80/665/CEE sono risultate inadeguate e che è necessario precisare i criteri in causa;

considerando che, per i motivi sopra esposti, è opportuno abrogare la direttiva 80/665/CEE e adottare le disposizioni del caso;

considerando che tali disposizioni devono innanzitutto tenere conto del fatto che la malattia può rimanere ad uno stato latente e non essere scoperta durante il periodo di crescita delle patate o di immagazzinaggio dei tuberi e che essa può quindi essere efficacemente combattuta soltanto mediante la produzione e l'impiego di tuberi-seme indenni da infezione; che, in secondo luogo, è necessario effettuare accertamenti sistematici ufficiali per localizzarla; che la diffusione dell'infezione da pianta a pianta durante la stagione vegetativa non è il fattore più importante, ma che l'infezione può esistere nel periodo invernale in tuberi-seme provenienti da patate dimenticate (tuberi-seme spontanei), che costituiscono il più grave rischio di infezione da una stagione all'altra; che l'infezione si trasmette soprattutto quando le patate sono in contatto tra loro o con attrezzi utilizzati per l'impianto, la raccolta e la manipolazione, ovvero con imballaggi utilizzati per il trasporto e il magazzino, contaminati in occasione di un precedente contatto con patate infette; che questi oggetti contaminati possono conservare il loro potere infettivo per un certo tempo dal momento della contaminazione; che la disseminazione della malattia può essere ridotta o evitata mediante disinfezione degli oggetti in causa; che la contaminazione dei tuberi-seme rappresenta un grave rischio di diffusione dell'infezione;

considerando che, per stabilire i criteri di lotta generali e quelli supplementari o più rigorosi adottati dagli Stati membri per prevenire l'introduzione dell'infezione nel loro territorio, è opportuno stabilire tra gli Stati membri e la Commissione una stretta collaborazione nell'ambito del comitato fitosanitario permanente (in prosieguo: «comitato»),

HA ADOTTATO LA PRESENTE DIRETTIVA:

Articolo 1

Oggetto della presente direttiva sono i provvedimenti da adottare negli Stati membri per combattere il marciume anulare della patata provocato dall'agente patogeno *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. subsp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., in appresso denominato «organismo nocivo», al fine di:

- a) localizzarlo e determinarne la distribuzione,
- b) prevenirne la comparsa e la disseminazione,
- c) qualora venga individuato, prevenirne la disseminazione e combatterlo ai fini della sua eradicazione.

Articolo 2

1. Gli Stati membri effettuano sistematicamente indagini ufficiali riguardo all'organismo nocivo su tuberi e, se del caso, su piante di patata (*Solanum tuberosum* L.) originari dei rispettivi territori nazionali, per confermare l'assenza di detto organismo.

Per queste indagini, nel caso dei tuberi vanno prelevati campioni di tuberi-seme e di altri tuberi di patata, preferibilmente da partite immagazzinate, sottoponendoli a prove di laboratorio ufficiali o condotte sotto controllo ufficiale, utilizzando il metodo di cui all'allegato I per l'individuazione e la diagnosi dell'organismo nocivo. Se del caso, si può inoltre effettuare su altri campioni un'ispezione visiva ufficiale o condotta sotto controllo ufficiale comprendente il taglio di tuberi.

Nel caso di piante, queste indagini sono effettuate con i metodi idonei e i campioni sono sottoposti alle opportune prove ufficiali o condotte sotto controllo ufficiale.

Il numero, l'origine, la stratificazione e il momento del prelievo dei campioni sono stabiliti dall'organismo ufficiale responsabile quale definito dalla direttiva 77/93/CEE, in base a fondati principi scientifici e

▼B

statistici e ai dati biologici relativi all'organismo nocivo, tenendo altresì conto dei sistemi particolari di produzione della patata negli Stati membri interessati. Gli altri Stati membri e la Commissione vengono informati annualmente dei particolari relativi a queste operazioni, in modo da garantire tra gli Stati membri livelli comparabili di certezza diagnostica per la conferma dell'assenza dell'organismo nocivo.

2. L'esito delle indagini ufficiali di cui al paragrafo 1 va notificato agli altri Stati membri e alla Commissione almeno una volta all'anno. Gli specifici elementi notificati hanno carattere riservato. Essi possono essere sottoposti al comitato secondo la procedura prevista all'articolo 16 bis della direttiva 77/93/CEE.

3. Le seguenti disposizioni possono essere adottate secondo la procedura prevista all'articolo 16 bis della direttiva 77/93/CEE:

- le modalità delle indagini di cui al paragrafo 1, da effettuare in base a fondati principi statistici e scientifici;
- le modalità della notificazione di cui al paragrafo 2.

4. Le seguenti disposizioni sono adottate secondo la procedura prevista all'articolo 16 bis della direttiva 73/93/CEE:

- il metodo idoneo per le indagini e le prove di cui al paragrafo 1, terzo comma.

Articolo 3

Gli Stati membri provvedono affinché ogniqualvolta si sospetti o venga confermata la presenza nel loro territorio dell'organismo nocivo nelle piante e nei tuberi-seme o nei tuberi raccolti, immagazzinati o commercializzati, ne venga data comunicazione ai rispettivi organismi ufficiali responsabili.

Articolo 4

1. Qualora vi sia una manifestazione sospetta, gli organismi ufficiali responsabili dello Stato membro ove è stato segnalato il caso provvedono ad effettuare prove di laboratorio ufficiali o condotte sotto controllo ufficiale, utilizzando il metodo di cui all'allegato I e secondo quanto disposto nell'allegato II, punto 1, al fine di confermare o smentire la manifestazione sospetta; nel primo caso si applicano le disposizioni dell'allegato II, punto 2.

2. In attesa della conferma o smentita della manifestazione sospetta di cui al paragrafo 1, nei casi di manifestazione sospetta in cui:

- i) siano stati individuati sintomi diagnostici visivi della malattia, oppure,
- ii) sia risultata positiva una prova di immunofluorescenza, quale specificata nell'allegato I, o un'altra prova idonea;

gli organismi ufficiali responsabili degli Stati membri:

- a) vietano il movimento di tutte le partite o spedizioni da cui sono stati prelevati i campioni, a meno che non avvenga sotto il controllo dei servizi stessi e purché sia stata accertata l'inesistenza di rischi effettivi di disseminazione dell'organismo nocivo;
- b) attuano interventi opportuni per risalire all'origine della manifestazione sospetta;
- c) introducono altri provvedimenti cautelativi commisurati al rischio stimato, onde scongiurare la disseminazione dell'organismo nocivo. Tali provvedimenti possono comprendere in particolare il controllo ufficiale del trasporto di tutti gli altri tuberi o piante entro o da qualsiasi impianto associato alla manifestazione sospetta.

3. Le seguenti disposizioni possono essere adottate secondo la procedura prevista dall'articolo 16 bis della direttiva 77/93/CEE:

- i provvedimenti menzionati al paragrafo 2, lettera c).

4. Le seguenti disposizioni sono adottate secondo la procedura prevista all'articolo 16 bis della direttiva 77/93/CEE:

- le altre opportune prove di cui al paragrafo 2, punto ii)



Articolo 5

1. Qualora le prove di laboratorio ufficiali o condotte sotto controllo ufficiale utilizzando il metodo di cui all'allegato I confermino la presenza dell'organismo nocivo in un campione di tuberi, piante o parti di piante, gli organismi ufficiali competenti di uno Stato membro, sulla base di fondati principi scientifici, dei dati biologici relativi all'organismo nocivo e dei sistemi particolari di produzione, lavorazione e commercializzazione di detto Stato membro;

- a) dichiarano contaminati i tuberi o le piante, una spedizione e/o una partita, i macchinari, i veicoli, i battelli, il magazzino, o relative parti, nonché qualsiasi altro oggetto, compresi i materiali di imballaggio, da cui è stato prelevato il campione e, se del caso, il luogo o i luoghi di produzione e l'appezzamento o gli appezzamenti dove sono stati raccolti i tuberi o le piante;
- b) determinano, tenuto conto delle disposizioni dell'allegato III, punto 1, l'entità della contaminazione probabile avvenuta tramite contatto prima o dopo la raccolta o attraverso un nesso tra il ciclo produttivo e la contaminazione dichiarata;
- c) delimitano una zona in base alla dichiarazione di contaminazione di cui alla lettera a), alla determinazione dell'entità della contaminazione probabile di cui alla lettera b) e alla potenziale disseminazione dell'organismo nocivo, tenuto conto delle disposizioni dell'allegato III, punto 2.

2. Gli Stati membri notificano immediatamente agli altri Stati membri e alla Commissione conformemente alle disposizioni dell'allegato III, punto 3, qualsiasi caso di contaminazione dichiarato ai sensi del paragrafo 1, lettera a) e i particolari relativi alla delimitazione della zona ai sensi del paragrafo 1, lettera c).

Gli elementi specifici della notifica sono da considerarsi riservati. Essi possono essere sottoposti al comitato secondo la procedura prevista all'articolo 16 bis della direttiva 77/93/CEE.

3. In seguito alla notifica di cui al paragrafo 2 e in base agli elementi ivi menzionati, gli altri Stati membri specificati nella notifica dichiarano, se del caso, la contaminazione, determinano l'entità della contaminazione probabile e delimitano una zona in conformità al paragrafo 1, lettere a), b) e c), rispettivamente.

Articolo 6

Gli Stati membri prescrivono che, se dei tuberi o delle piante sono stati dichiarati contaminati ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), le prove di cui all'articolo 4, paragrafo 1 vanno fatte su scorte di patate che hanno una relazione clonale con quelle contaminate. Le prove sono eseguite sul numero di tuberi o piante necessario per stabilire l'origine probabile dell'infezione e l'entità della contaminazione probabile, preferibilmente secondo il grado di rischio.

Una volta effettuate le prove si procede, se del caso, a una nuova dichiarazione di contaminazione, alla determinazione dell'entità della contaminazione probabile e alla delimitazione di una zona, rispettivamente ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettere a), b) e c).

Articolo 7

1. Gli Stati membri vietano la messa a dimora di tuberi o piante dichiarati contaminati ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a) e dispongono che essi, sotto il controllo degli organismi ufficiali competenti:

- siano distrutti, o
- siano altrimenti eliminati, nel quadro di interventi sotto controllo ufficiale, secondo quanto disposto nell'allegato IV, punto 1, sempre che sia stata accertata l'inesistenza di rischi identificabili di disseminazione dell'organismo nocivo.

▼B

2. Gli Stati membri vietano la messa a dimora di tuberi o piante ritenuti probabilmente contaminati ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera b) e, salvi restando i risultati delle prove di cui all'articolo 6 per le scorte di piante in relazione clonale, provvedono affinché, sotto il controllo degli organismi ufficiali competenti, detti tuberi o piante siano destinati ad un'utilizzazione idonea o vengano eliminati secondo quanto disposto nell'allegato IV, punto 2, in condizioni tali da escludere qualsiasi rischio identificabile di disseminazione dell'organismo nocivo.

3. Gli Stati membri prescrivono che i macchinari, i veicoli, i battelli, il magazzino, o relative parti, nonché qualsiasi altro oggetto, compresi i materiali d'imballaggio, dichiarati contaminati ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), o ritenuti probabilmente contaminati ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera b), siano distrutti, ovvero puliti e disinfettati secondo metodi adeguati di cui all'allegato IV, punto 3. Dopo la disinfezione, gli oggetti descritti non sono più considerati contaminati.

4. Fatte salve le misure messe in atto a norma dei paragrafi 1, 2 e 3 del presente articolo, gli Stati membri prescrivono una serie di interventi, quali sono specificati nell'allegato IV, punto 4, da attuare nella zona delimitata ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera c).

Articolo 8

1. Gli Stati membri dispongono che i tuberi-seme di patata debbano essere conformi ai requisiti della direttiva 77/93/CEE e derivare direttamente da materiali ottenuti nell'ambito di un programma ufficialmente approvato che sono risultati esenti dall'organismo nocivo in prove ufficiali o eseguite sotto controllo ufficiale, utilizzando il metodo di cui all'allegato I.

Dette prove sono eseguite:

- sulle piante del materiale clonale di partenza, qualora la contaminazione colpisca una produzione di tuberi-seme di patata,
 - sulle piante del materiale clonale di partenza o su campioni rappresentativi dei tuberi-seme di base o degli stadi anteriori, negli altri casi.
2. Le seguenti disposizioni possono essere adottate secondo la procedura prevista dall'articolo 16 bis della direttiva 77/93/CEE:
- le modalità di applicazione del paragrafo 1, secondo comma, primo trattino,
 - le disposizioni sui campioni rappresentativi di cui al paragrafo 1, secondo comma, secondo trattino.

Articolo 9

Gli Stati membri vietano la detenzione e la manipolazione dell'organismo nocivo.

Articolo 10

Fatte salve le disposizioni della direttiva 77/93/CEE, gli Stati membri possono autorizzare deroghe alle disposizioni degli articoli 6, 7 e 9 della presente direttiva per prove o scopi scientifici, nonché per lavori di selezione varietale, purché tali deroghe non compromettano il controllo dell'organismo nocivo e non creino un rischio di disseminazione dello stesso.

Articolo 11

Gli Stati membri possono adottare, qualora risultino necessarie, disposizioni supplementari o più rigorose per combattere l'organismo nocivo o per prevenirne la disseminazione, sempreché siano conformi alle disposizioni della direttiva 77/93/CEE.

Le disposizioni addizionali previste al primo comma possono comprendere la prescrizione che siano messi a dimora solo tuberi-seme di patate ufficialmente certificati o ufficialmente controllati per l'osservanza delle

▼B

pertinenti norme fitosanitarie. Ciò si applica in particolare qualora gli agricoltori siano autorizzati ad usare, nella loro azienda, tuberi-seme di patate ottenute dal loro proprio raccolto e quando sono messi a dimora tuberi-seme di produzione propria.

I particolari relativi a tali disposizioni vengono notificati agli altri Stati membri e alla Commissione.

Articolo 12

Le eventuali modifiche degli allegati della presente direttiva, da apportare tenendo conto degli sviluppi tecnici e scientifici, sono adottate secondo la procedura prevista dall'articolo 16 bis della direttiva 77/93/CEE.

Articolo 13

1. Gli Stati membri adottano e pubblicano, entro il 15 novembre 1993, le disposizioni legislative, regolamentari o amministrative necessarie per conformarsi alla presente direttiva. Essi ne informano direttamente la Commissione.

Quando gli Stati membri adottano tali disposizioni, queste contengono un riferimento alla presente direttiva o sono corredate di un siffatto riferimento all'atto della pubblicazione ufficiale. Le modalità di tale riferimento sono decise dagli Stati membri.

Gli Stati membri applicano dette disposizioni a decorrere dal 16 novembre 1993.

2. Gli Stati membri comunicano senza indugio alla Commissione tutte le disposizioni del diritto nazionale emanate nella materia disciplinata dalla presente direttiva. La Commissione ne informa gli altri Stati membri.

Articolo 14

La direttiva 80/665/CEE è abrogata con effetto al 16 novembre 1993.

Articolo 15

Gli Stati membri sono destinatari della presente direttiva.

▼ **M1***ALLEGATO I***SCHEMA PER LA DIAGNOSI, IL RILEVAMENTO E L'IDENTIFICAZIONE DEL BATTERIO DEL MARCIUME ANULARE DELLA PATATA, *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* (Smith) Davis *et al.* ssp. *SEPEDONICUS* (Spieckermann e Kotthoff) Davis *et al.*****CAMPO DI APPLICAZIONE DELLO SCHEMA DIAGNOSTICO**

Lo schema presentato descrive i procedimenti da usare per:

- i) la diagnosi del marciume anulare nei tuberi e nelle piante di patata;
- ii) il rilevamento di *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* nei campioni di tuberi e piante di patata;
- iii) l'identificazione di *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*C. m.* subsp. *sepedonicus*).

PRINCIPI GENERALI

I protocolli ottimizzati per i vari metodi, i reagenti convalidati e i dettagli per la preparazione del materiale necessario per i saggi ed i controlli figurano nelle appendici. Un elenco dei laboratori coinvolti nell'ottimizzazione e nella convalida dei protocolli figura nell'appendice 1.

Dato che i protocolli comportano il rilevamento di un organismo da quarantena e prevedono l'uso di colture vitali di *C. m.* subsp. *sepedonicus* come materiale di controllo, le procedure dovranno essere svolte in opportune condizioni di quarantena, con adeguate strutture per lo smaltimento dei rifiuti e nell'ambito di adeguate autorizzazioni rilasciate dalle autorità ufficiali per la quarantena dei vegetali.

I parametri dei saggi devono garantire un rilevamento certo e riproducibile dei livelli di *C. m.* subsp. *sepedonicus* ai valori di soglia dei metodi prescelti.

È indispensabile un'accurata preparazione dei controlli positivi.

La realizzazione dei saggi sulla base delle soglie richieste implica inoltre la corretta regolazione, manutenzione e taratura degli strumenti, una corretta manipolazione e conservazione dei reagenti nonché l'applicazione di tutte le misure atte ad impedire la contaminazione tra i campioni, come ad esempio la separazione dei controlli positivi dai campioni da saggiare. Per evitare errori amministrativi e di altro genere devono essere applicate norme di controllo della qualità, in particolare per quanto riguarda l'etichettatura e la documentazione.

Una manifestazione sospetta ai sensi dell'articolo 4, paragrafo 2, della direttiva 93/85/CEE implica un risultato positivo nei saggi diagnostici o di selezione preliminare fatti su un campione secondo quanto indicato nei diagrammi di flusso.

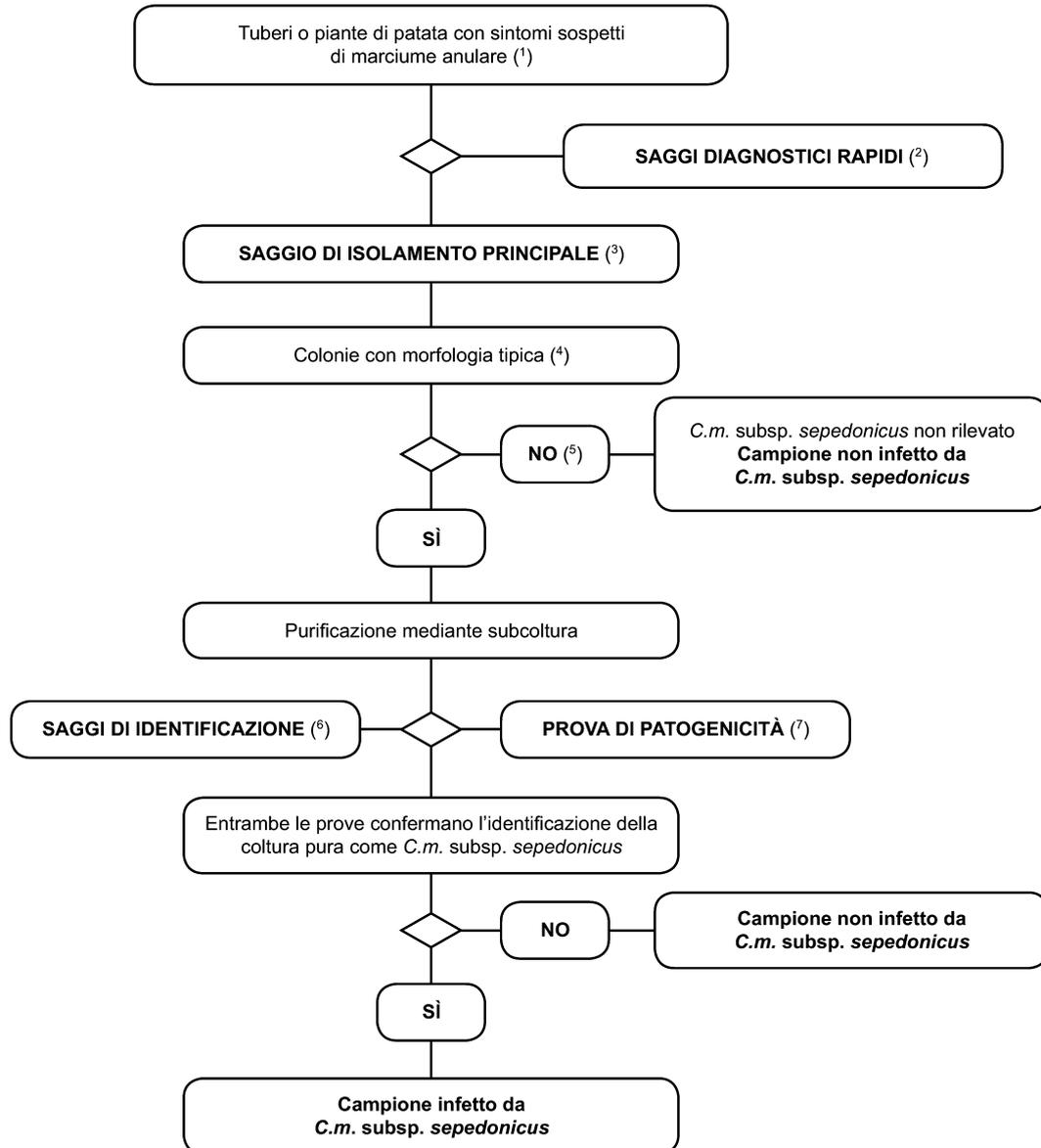
Se il primo saggio di selezione preliminare (IF o PCR/FISH) risulta positivo si sospetta una contaminazione da *C. m.* ssp. *sepedonicus* ed occorre procedere ad un secondo saggio. Se il secondo saggio di selezione preliminare è positivo, il sospetto è confermato (manifestazione sospetta) ed occorre procedere ai saggi successivi, secondo quanto previsto dallo schema. Se il secondo saggio di selezione preliminare è negativo, il campione non si considera contaminato da *C. m.* ssp. *sepedonicus*.

Una prova di immunofluorescenza positiva ai sensi dell'articolo 4, paragrafo 2, si definisce pertanto come un risultato positivo al saggio IF confermato da un secondo saggio di selezione preliminare (PCR/FISH).

La presenza confermata ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, della direttiva 93/85/CEE implica l'isolamento e l'identificazione di una coltura pura di *C. m.* subsp. *sepedonicus* di cui si confermi la patogenicità.

1. PRESENTAZIONE IN DIAGRAMMI DI FLUSSO**1.1. Schema di rilevamento per la diagnosi del marciume anulare della patata nei tuberi e nelle piante di patata che presentano sintomi della malattia**

Il procedimento sotto indicato deve essere applicato ai tuberi e alle piante di patata che presentano sintomi tipici o sospetti di marciume anulare. Esso comporta un saggio rapido di selezione preliminare, l'isolamento dell'agente patogeno dal tessuto vascolare infetto su appropriati terreni di coltura artificiali e, in caso di esito positivo, l'identificazione della coltura come *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

▼ **M1**

(1) La descrizione dei sintomi è fornita nella sezione 2.

(2) I saggi idonei sono:
— colorazione IF (sezione 4),
— saggio PCR (sezione 6),
— saggio FISH (sezione 5).

(3) Sebbene l'isolamento del patogeno da materiali con sintomi tipici mediante la tecnica dell'isolamento diretto sia immediato, in fasi avanzate di infezione la crescita delle sue colonie può non aver luogo. I batteri saprofiti che si sviluppano nel tessuto malato possono eliminare o inibire il patogeno sul substrato di isolamento. Si raccomanda pertanto di utilizzare substrati sia selettivi che non selettivi, preferibilmente MTNA (sezione 8) o saggio biologico (sezione 7).

(4) La morfologia tipica di una colonia è descritta nella sezione 8.

(5) Se il saggio di isolamento è negativo, ma i sintomi della malattia sono tipici, l'isolamento deve essere ripetuto.

(6) È possibile ottenere un'identificazione affidabile di una coltura pura di *C.m. subsp. sepedonicus* usando i saggi elencati nella sezione 9.

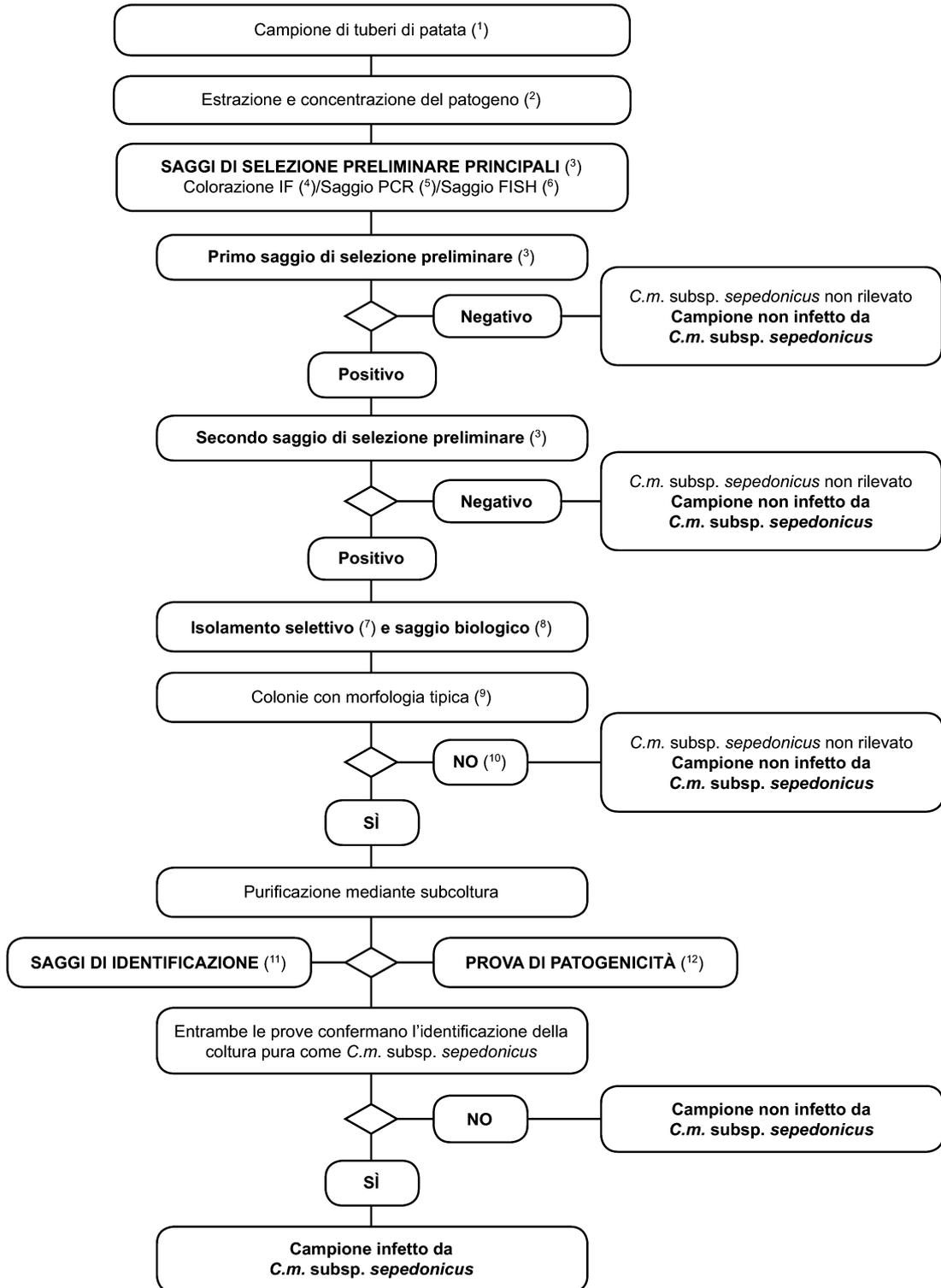
(7) Il saggio di patogenicità è descritto nella sezione 10.

▼ **M1**1.2. **Schema di rilevamento e identificazione di *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in campioni di tuberi di patata asintomatici***Principi*

Il procedimento è inteso a rilevare le infezioni latenti nei tuberi di patata. Un risultato positivo ottenuto da almeno due saggi di selezione preliminare, basati su principi biologici differenti, deve essere confermato dall'isolamento del patogeno e quindi, in caso di isolamento di colonie tipiche, dall'identificazione di una coltura pura di *C. m.* subsp. *sepedonicus*. Il fatto che uno solo dei saggi di selezione preliminare risulti positivo non è sufficiente per considerare il campione sospetto.

I saggi di selezione preliminare e i saggi di isolamento devono consentire soglie di rilevamento comprese tra 10^3 e 10^4 cellule per ml di sedimento risospeso, incluse come controllo positivo in ciascuna serie di saggi.

▼ M1

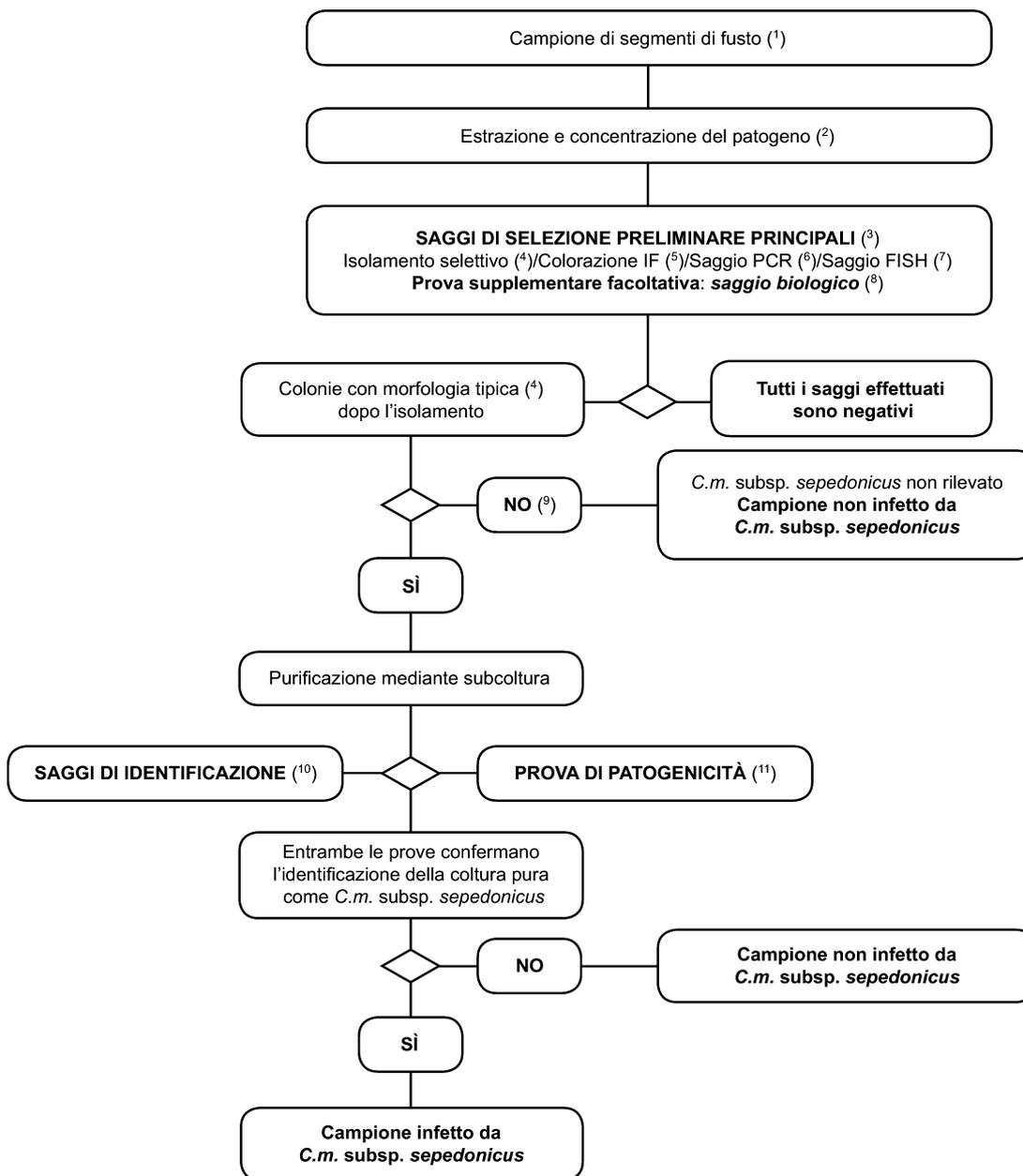


▼ **M1**

- (¹) Il campione standard è di 200 tuberi. Il procedimento può essere tuttavia applicato a campioni più piccoli, qualora il suddetto quantitativo non sia disponibile.
- (²) I metodi di estrazione e concentrazione del patogeno sono descritti nella sezione 3.1.
- (³) Se almeno due saggi basati su principi biologici diversi danno esito positivo occorre procedere all'isolamento e alla conferma. Eseguire almeno un saggio di selezione preliminare. In caso di esito negativo, il campione è considerato negativo. In caso di esito positivo, tale risultato deve essere confermato da un secondo o da più saggi di selezione preliminare basati su principi biologici diversi. Se il secondo o i successivi saggi di selezione preliminare risultano negativi, il campione è considerato negativo. Non sono necessarie ulteriori prove.
- (⁴) Colorazione di immunofluorescenza (IF).
Servirsi sempre di un anticorpo policlonale per il saggio IF; l'aggiunta di anticorpi monoclonali può conferire una maggiore specificità (cfr. sezione 4).
- (⁵) Saggio PCR.
Servirsi di reagenti e protocolli PCR adeguatamente convalidati (cfr. sezione 6).
- (⁶) Saggio FISH.
Servirsi di reagenti e protocolli convalidati (cfr. sezione 5).
- (⁷) Isolamento selettivo.
e fatto con substrato MTNA o NCP-88 ed a una diluizione 1:100 del sedimento risospeso, risulta in molti casi un metodo adeguato per l'isolamento diretto di *C. m. subsp. sepedonicus*. È possibile ottenere colonie tipiche da 3 a 10 giorni dopo l'inseminazione della piastra. Il patogeno può essere quindi purificato e identificato. Ai fini di un pieno sfruttamento del suo potenziale, il saggio richiede un'accurata preparazione dei coni ombelicali per eliminare i batteri secondari associati al tessuto della patata che sono competitori di *C. m. subsp. sepedonicus* sul terreno di coltura e potrebbero incidere sullo sviluppo del patogeno. Qualora il saggio in piastra non ottenga risultati, l'isolamento deve essere effettuato a partire da piante usate per il saggio biologico (cfr. sezione 8).
- (⁸) Il saggio biologico è usato per l'isolamento di *C. m. subsp. sepedonicus* dai sedimenti di estratto di patata sfruttando le melanzane (*Solanum melongena*) come mezzo selettivo di arricchimento. Il saggio richiede condizioni ottimali di incubazione, come specificato nel presente metodo. È molto probabile che i batteri inibitori di *C. m. subsp. sepedonicus* su substrato MTNA o NCP-88 non interferiscano in questo saggio (cfr. sezione 7).
- (⁹) La morfologia tipica della colonia è descritta nella sezione 8.
- (¹⁰) L'esito delle colture o del saggio biologico può essere compromesso a causa di una competizione o inibizione da parte di batteri saprofiti. Se le prove di selezione preliminare danno esito positivo ma i saggi di isolamento sono negativi, ripetere questi ultimi sullo stesso precipitato oppure prelevando ulteriori tessuti vascolari in prossimità del cono ombelicale di tuberi tagliati provenienti dallo stesso campione e, se necessario, saggiare altri campioni.
- (¹¹) È possibile ottenere un'identificazione affidabile di presunte colture pure di *C. m. subsp. sepedonicus* usando i saggi descritti nella sezione 9.
- (¹²) La prova di patogenicità è descritta nella sezione 10.

▼ **M1**

- 1.3. **Schema di rilevamento e identificazione di *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in campioni di piante di patata asintomatiche.**



▼ **M1**

- (¹) Per le dimensioni raccomandate del campione cfr. la sezione 3.2.
- (²) I metodi di estrazione e concentrazione del patogeno sono descritti nella sezione 3.2.
- (³) Se almeno due saggi basati su principi biologici diversi danno esito positivo occorre procedere all'isolamento e alla conferma. Eseguire almeno un saggio di selezione preliminare. In caso di esito negativo, il campione è considerato negativo. In caso di esito positivo, tale risultato deve essere confermato da un secondo o da più saggi di selezione preliminare basati su principi biologici diversi. Qualora il secondo o i successivi saggi di selezione preliminare risultino negativi, il campione è considerato negativo. Non sono necessarie ulteriori prove.
- (⁴) Il saggio di isolamento selettivo e la morfologia tipica della colonia sono descritti nella sezione 8.
- (⁵) La colorazione IF è descritta nella sezione 4.
- (⁶) I saggi PCR sono descritti nella sezione 6.
- (⁷) Il saggio FISH è descritto nella sezione 5.
- (⁸) Il saggio biologico è descritto nella sezione 7.
- (⁹) L'esito delle colture o del saggio biologico può essere compromesso a causa di una competizione o inibizione da parte di batteri saprofiti. Se le prove di selezione preliminare danno esito positivo ma i saggi di isolamento sono negativi, ripetere questi ultimi e, se necessario, saggiare altri campioni.
- (¹⁰) È possibile ottenere un'identificazione affidabile di presunte colture pure di *C. m. subsp. sepedonicus* usando i saggi descritti nella sezione 9.
- (¹¹) La prova di patogenicità è descritta nella sezione 10.

▼ **M1**

2. INDAGINE VISIVA VOLTA AD ACCERTARE SINTOMI DI MARCIUME ANULARE

2.1. **Piante di patata**

Nel contesto climatico europeo, i sintomi si osservano raramente in pieno campo e, comunque, spesso solo alla fine della stagione. Inoltre, essi sono spesso nascosti da altre malattie, senescenza o danni meccanici, o si confondono con questi. Può dunque facilmente accadere che le ispezioni in campo non riescano a rilevarli. I sintomi dell'avvizzimento sono molto diversi da quelli del marciume anulare; l'avvizzimento è in genere lento e si limita inizialmente ai margini delle foglie. Le giovani foglie infette spesso continuano a svilupparsi, sebbene in misura minore nelle zone colpite, e ciò le porta ad assumere forme inconsuete. Le foglie colpite da blocco dei tessuti vascolari nella parte bassa del fusto spesso sviluppano zone intercostali clorotiche, di colore giallo-arancio. Le foglioline, le foglie nonché i fusti infetti finiscono talvolta per morire. Spesso le foglie e i tuberi appaiono semplicemente più piccoli. In alcuni casi le piante subiscono un arresto della crescita. Foto a colori di una serie di sintomi sono disponibili sul sito web <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

2.2. **Tuberi di patata**

I primi sintomi sono una leggera trasparenza o semitrasparenza del tessuto senza rammollimento attorno al sistema vascolare, soprattutto in prossimità del cono ombelicale. L'anello vascolare sul cono ombelicale può presentare un colore leggermente più scuro del normale. Il primo sintomo facilmente riscontrabile è rappresentato da una colorazione giallastra dell'anello vascolare e da masserelle di consistenza caseosa che fuoriescono dai vasi se il tubero è premuto ai lati. Tale essudato contiene milioni di batteri. Si può avere poi imbrunimento del tessuto vascolare e a questo stadio il tubero presenta sintomi simili a quelli del marciume bruno causato da *Ralstonia solanacearum*. Inizialmente questi sintomi possono interessare solo una parte dell'anello, non necessariamente quella in prossimità dell'ombelico, ed in seguito estendersi gradualmente all'intero anello. Con il progredire dell'infezione si ha la distruzione del tessuto vascolare e la zona corticale può separarsi dal tessuto midollare. Quando l'infezione è in stadio avanzato, sulla superficie del tubero compaiono screpolature che sono spesso bruno-rossicce ai bordi. In Europa si sono avuti recentemente alcuni casi in cui il midollo centrale marciva contemporaneamente all'anello vascolare, dando luogo ad un'invasione secondaria con comparsa di cavità interne e necrosi. Un'invasione fungina o batterica secondaria può mascherare i sintomi rendendo difficile, se non impossibile, la distinzione tra i sintomi di uno stadio avanzato del marciume anulare e quelli di altre cancrene della patata. È possibile che si manifestino sintomi atipici. Foto a colori di una serie di sintomi sono disponibili sul sito web <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

3. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

3.1. **Tuberi di patata**

Nota:

- Il campione standard è di 200 tuberi per saggio. Un campionamento più ampio richiede l'esecuzione di più saggi su campioni di queste dimensioni. Un maggior numero di tuberi nel campione produrrà inibizione o una difficile interpretazione dei risultati. Il procedimento può essere tuttavia applicato efficacemente anche a campioni di dimensioni inferiori, qualora non si disponga di 200 tuberi.
- La convalida di tutti i metodi di rilevamento descritti di seguito è basata su saggi effettuati su campioni di 200 tuberi.
- L'estratto di patata descritto di seguito può essere anche usato per il rilevamento del batterio del marciume bruno della patata (*Ralstonia solanacearum*).

Trattamento preliminare facoltativo da far precedere alla preparazione del campione:

Lavare i tuberi. Usare disinfettanti appropriati (composti clorurati qualora si proceda al saggio PCR, al fine di eliminare l'eventuale DNA del patogeno) e detergenti tra un campione e l'altro. Far asciugare i tuberi all'aria. Questo procedimento di lavaggio non è obbliga-

▼ **M1**

torio, ma risulta particolarmente utile per i campioni che presentano residui di terra e nel caso in cui si debba effettuare un saggio PCR o un isolamento diretto.

- 3.1.1. Rimuovere con un bisturi o con un pelapatate pulito e disinfettato la buccia intorno all'ombelico di ciascun tubero, in modo da rendere visibile il tessuto vascolare. Asportare accuratamente un piccolo cono di tessuto vascolare dall'ombelico di ciascun tubero, riducendo al minimo la quantità di tessuto non vascolare (cfr. il sito web <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>)

Nota:

Mettere da parte i tuberi con sintomi sospetti di marciume anulare e saggiarli individualmente.

Se nel corso dell'asportazione del cono ombelicale vengono osservati sintomi sospetti di marciume anulare è necessario procedere ad un'indagine visiva del tubero dopo averlo tagliato vicino all'ombelico. I tuberi tagliati che presentano sintomi sospetti devono essere suberificati per 2 giorni a temperatura ambiente e conservati in quarantena ad una temperatura compresa tra 4 e 10 °C fino al completamento di tutte le prove. Tutti i tuberi del campione, compresi quelli con sintomi sospetti, devono essere conservati secondo quanto previsto all'allegato II.

- 3.1.2. Raccogliere i coni ombelicali in contenitori monouso nuovi che possano essere chiusi e/o sigillati (qualora vengano riutilizzati, i contenitori devono essere puliti e disinfettati accuratamente mediante composti clorurati). I coni ombelicali andrebbero di preferenza trattati immediatamente. Se ciò non fosse possibile, conservarli nel contenitore, senza aggiunta di tampone, refrigerati per non più di 72 ore o a temperatura ambiente per non più di 24 ore. Il disseccamento e la suberificazione dei coni, nonché lo sviluppo di saprofiti durante il periodo di conservazione, possono ostacolare il rilevamento del batterio del marciume anulare.

- 3.1.3. Trattare i coni ombelicali secondo una delle seguenti procedure:

a) coprire i coni con un volume sufficiente (circa 40 ml) di tampone di estrazione (Appendice 3) e porre in un agitatore rotativo (50-100 giri/m) per 4 ore a non più di 24 °C o per 16-24 ore se refrigerati;

oppure

b) L'omogeneizzare i coni con un volume sufficiente (circa 40 ml) di tampone di estrazione (Appendice 3) in un mixer (per esempio Waring o Ultra Thurax) o schiacciandoli in un sacchetto di macerazione monouso sigillato (per esempio Stomacher o Bioreba in polietilene di elevato spessore, 150 mm × 250 mm, sterile per irradiazione) usando un martello di gomma o uno strumento di macinazione appropriato (per esempio Homex).

Nota:

L'omogeneizzazione dei campioni per mezzo di un mixer comporta un rischio elevato di contaminazione incrociata. Prendere opportune precauzioni per evitare versamenti o generazione di aerosol liquidi nel corso del processo di estrazione. Assicurarsi che per ogni campione vengano usati lame e contenitori appena sterilizzati. Qualora si debba effettuare un saggio PCR, evitare i residui di DNA sui contenitori o gli apparecchi di macinazione. Per il saggio PCR si raccomanda lo schiacciamento in sacchetti monouso e l'impiego di provette monouso.

- 3.1.4. Far decantare il supernatante. Se eccessivamente torbido, chiarificare mediante centrifugazione a bassa velocità (non oltre 180 g per 10 minuti a una temperatura compresa tra 4 e 10 °C) o filtrazione sotto vuoto (40-100 µm), lavando il filtro con una dose supplementare (10 ml) di tampone di estrazione (Appendice 3).

- 3.1.5. Concentrare la frazione batterica mediante centrifugazione a 7 000 g per 15 minuti (o 10 000 g per 10 minuti) a una temperatura compresa tra 4 e 10 °C e scartare il supernatante senza far muovere il sedimento.

- 3.1.6. Risospingere il sedimento in 1,5 ml di tampone per sedimento da centrifuga (Appendice 3). Usare 500 µl per il rilevamento di *C. m. subsp. sepedonicus*, 500 µl per il rilevamento di *Ralstonia solanacearum* e 500 µl a fini di riferimento. Aggiungere glicerolo sterile a una concentrazione finale del 10-25 % (v/v) ai 500 µl del quantitativo di riferimento e al resto del quantitativo da saggiare, mescolare nel

▼ **M1**

vortex e conservare ad una temperatura compresa tra -16 e -24 °C (settimane) o tra -68 e -86 °C (mesi). Mantenere i quantitativi da saggiare a una temperatura compresa tra 4 e 10 °C durante il saggio.

Non è consigliabile procedere a cicli ripetuti di congelamento e scongelamento.

Qualora sia richiesto un trasporto dell'estratto, la consegna deve essere effettuata in un contenitore refrigerato entro un massimo di 24-48 ore.

- 3.1.7. È indispensabile che tutti i controlli e i campioni positivi di *C. m. subsp. sepedonicus* siano trattati separatamente per evitare contaminazioni. Ciò vale per i vetrini di immunofluorescenza e per tutti i saggi.

3.2. **Piante di patata**

Nota:

Ai fini del rilevamento di infezioni latenti di *C. m. subsp. sepedonicus* si consiglia di saggiare campioni composti. Il procedimento può essere applicato efficacemente a campioni composti comprendenti fino a un massimo di 200 segmenti di fusto. (Qualora si effettuino campagne di monitoraggio a fini di sorveglianza, esse devono basarsi su un campione statisticamente rappresentativo della popolazione di piante in esame).

- 3.2.1. Servendosi di un coltello o di un paio di forbici da giardinaggio pulite e disinfettate, asportare un segmento di 1-2 cm dalla base di ciascun fusto, appena al di sopra del livello del terreno.

Disinfettare brevemente i segmenti di fusto con etanolo al 70 % e asciugare immediatamente tamponando con carta bibula.

Raccogliere i segmenti di fusto in un recipiente sterile chiuso secondo le procedure di campionamento di seguito indicate.

- 3.2.2. Trattare i segmenti di fusto con uno dei metodi seguenti:

a) coprire i segmenti con un volume sufficiente (circa 40 ml) di tampone di estrazione (Appendice 3) e porre in un agitatore rotativo (50-100 giri/m) per 4 ore a non più di 24 °C o per 16-24 ore se refrigerati;

oppure

b) trattare i segmenti immediatamente schiacciandoli in un sacchetto di macerazione resistente (per esempio Stomacher o Bioreba) con un volume adeguato di tampone di estrazione (Appendice 3) usando un martello di gomma o uno strumento di macinazione appropriato (per esempio Homex). Se ciò non fosse possibile, conservare i segmenti di fusto refrigerati per non più di 72 ore o a temperatura ambiente per non più di 24 ore.

- 3.2.3. Decantare il supernatante dopo averlo lasciato riposare per 15 minuti.

- 3.2.4. Non è in genere necessario procedere ad un'ulteriore chiarificazione dell'estratto o concentrazione della frazione batterica, che però possono essere ottenute mediante filtrazione e/o centrifugazione secondo quanto descritto ai punti 3.1.4 – 3.1.6.

- 3.2.5. Dividere l'estratto del campione puro o concentrato in due parti uguali. Mantenerne una metà a 4-10 °C durante il saggio e conservare l'altra metà con glicerolo sterile al 10-25 % (v/v) a una temperatura compresa tra -16 e -24 °C (settimane) o tra -68 e -86 °C (mesi) qualora siano necessari ulteriori saggi.

4. **COLORAZIONE DI IMMUNOFLUORESCENZA (SAGGIO IF)**

Principi

Tenuto conto della sua comprovata capacità di soddisfare le soglie richieste, si raccomanda l'uso del saggio IF come saggio di selezione preliminare principale.

Quando il saggio IF è usato come saggio di selezione preliminare principale e l'esito è positivo, occorre procedere ad un secondo saggio che può essere la PCR o il FISH. Quando il saggio IF è usato come secondo saggio di selezione preliminare e l'esito è positivo, per completare l'analisi occorre procedere ad ulteriori saggi sulla base del diagramma di flusso.

▼ **M1**

Nota:

Utilizzare sempre un anticorpo policlonale quando il saggio IF costituisce il saggio di selezione preliminare principale. In caso di esito positivo con un anticorpo policlonale, un'ulteriore selezione preliminare del campione con anticorpo monoclonale può offrire una maggiore specificità, ma rischia di essere meno sensibile.

Usare anticorpi contro un ceppo di riferimento di *C. m. subsp. sepedonicus*. Si consiglia di determinare il titolo di ciascun nuovo lotto di anticorpi. Il titolo si definisce come la più alta diluizione alla quale si verifica una reazione ottimale saggiando una sospensione contenente da 10^5 a 10^6 cellule per ml del ceppo omologo di *C. m. subsp. sepedonicus* e usando un coniugato appropriato di isotiocianato di fluoresceina (FITC), secondo le istruzioni del produttore. Gli anticorpi policlonali o monoclonali grezzi dovrebbero avere un titolo IF di almeno 1:2000. Durante il saggio, gli anticorpi dovrebbero essere usati a diluizioni di lavoro (WD) prossime o corrispondenti a tale titolo. Servirsi di anticorpi convalidati (cfr. il sito web <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Il saggio andrebbe effettuato su estratti di campione preparati al momento dell'uso. Se necessario, esso può essere fatto con successo su estratti conservati in glicerolo ad una temperatura compresa tra -68 e -86 °C. Il glicerolo può essere rimosso dal campione mediante aggiunta di 1 ml di tampone per sedimento da centrifuga (Appendice 4), ricentrifugazione per 15 minuti a 7 000 g e risospensione in un volume uguale di tampone per sedimento da centrifuga. Questa operazione non sempre è necessaria, soprattutto se i campioni vengono fissati ai vetrini mediante esposizione alla fiamma (cfr. sezione 2.2).

Preparare vetrini separati di controllo positivo del ceppo omologo o di qualunque altro ceppo di riferimento di *C. m. subsp. sepedonicus* sospeso in estratto di patata, come specificato nell'appendice 2, e facoltativamente in tampone.

Ove possibile si dovrebbe usare tessuto contaminato naturalmente (conservato mediante liofilizzazione o congelamento a una temperatura compresa tra -16 e -24 °C) come controllo analogo nello stesso vetrino.

Come controllo negativo, usare aliquote di estratto di campione precedentemente risultato negativo.

Utilizzare vetrini multipli per microscopio preferibilmente con 10 pozzetti di almeno 6 mm di diametro.

Eseguire il saggio sul materiale di controllo secondo lo stesso metodo usato per il/i campione/i.

4.1. Preparare i vetrini di saggio con uno dei seguenti procedimenti:

i) Per sedimenti contenenti una quantità relativamente ridotta di amido:

Trasferire con una pipetta un volume standard misurato (15 µl è un valore adeguato per un pozzetto di 6 mm di diametro - aumentare il volume per pozzetti più grandi) di una diluizione 1:100 del sedimento risospeso sul primo pozzetto. Successivamente trasferire con la pipetta un volume analogo di sedimento non diluito (1:1) sugli altri pozzetti della fila. La seconda fila può essere usata come duplicato o per un secondo campione, come illustrato nella figura 1.

ii) Per gli altri sedimenti:

Preparare diluizioni decimali (1:10 e 1:100) del sedimento risospeso nel tampone per sedimento. Trasferire con una pipetta un volume standard misurato (15 µl è un valore adeguato per un pozzetto di 6 mm di diametro - aumentare il volume per pozzetti più grandi) di sedimento risospeso su una fila di pozzetti. La seconda fila può essere usata come duplicato o per un secondo campione, come illustrato nella figura 2.

4.2. Far evaporare completamente le goccioline a temperatura ambiente o mediante riscaldamento a una temperatura compresa tra 40 e 45 °C. Fissare le cellule batteriche al vetrino scaldandolo (15 minuti a 60 °C), passandolo alla fiamma, con etanolo al 95 % o seguendo le istruzioni specifiche fornite dal produttore degli anticorpi.

▼ **M1**

Ove del caso, i vetrini fissati possono essere quindi conservati congelati in un contenitore ben asciutto per il tempo minimo necessario (fino a un massimo di tre mesi) prima di essere usati per ulteriori saggi.

4.3. Procedimento IF:

- i) Se il vetrino di saggio è stato preparato secondo il procedimento di cui al punto 4.1, i):

Preparare una serie di diluizioni 1:2 dell'anticorpo nel tampone IF. Il primo pozzetto dovrebbe avere 1/2 del titolo (T/2), gli altri rispettivamente 1/4 del titolo (T/4), 1/2 del titolo (T/2), il titolo (T) e il doppio del titolo (2T).

- ii) Se il vetrino di saggio è stato preparato secondo il procedimento di cui al punto 4.1 ii):

Preparare la diluizione di lavoro (WD) dell'anticorpo nel tampone IF. La diluizione di lavoro incide sulla specificità.

Figura 1. Preparazione del vetrino di saggio secondo i punti 4.1, i) e 4.3, i)

	Diluizione del sedimento risospeso					
	1/100	1/1	1/1	1/1	1/1	<input type="checkbox"/> Diluizione del sedimento risospeso
(T = titolo)	T/2	T/4	T/2	T	2T	<input type="checkbox"/> Diluizioni 1:2 dell'antisiero/anticorpo

Campione 1	●	●	●	●	●
	1	2	3	4	5
Duplicato del campione 1 o campione 2	●	●	●	●	●
	6	7	8	9	10

Figura 2. Preparazione del vetrino di saggio secondo i punti 4.1, ii) e 4.3, ii)

	Diluizione di lavoro dell'antisiero/anticorpo					
	1/1	1/10	1/100	vuoto	vuoto	<input type="checkbox"/> Diluizione decimale del sedimento risospeso

Campione 1	●	●	●	●	●
	1	2	3	4	5
Duplicato del campione 1 o campione 2	●	●	●	●	●
	6	7	8	9	10

- 4.3.1. Disporre i vetrini su carta umida. Coprire completamente ciascun pozzetto di saggio con la/le diluizione/i di anticorpo. Il volume di anticorpo messo su ciascun pozzetto deve essere almeno equivalente al volume di estratto.

In assenza di istruzioni specifiche da parte del fornitore degli anticorpi, si proceda come segue:

- 4.3.2. Mantenere in incubazione i vetrini su carta umida in recipiente chiuso per 30 minuti a temperatura ambiente (18-25 °C).
- 4.3.3. Scuotere via le goccioline da ciascun vetrino e sciacquare accuratamente con tampone IF. Lavare immergendo per 5 minuti nel tampone IF Tween (Appendice 3) e poi per 5 minuti nel tampone IF. Evitare la produzione di aerosol o il trasferimento di goccioline, che potrebbero provocare una contaminazione incrociata. Rimuovere accuratamente l'umidità in eccesso tamponando delicatamente con carta bibula.

▼ **M1**

- 4.3.4. Disporre i vetrini su carta umida. Coprire i pozzetti di saggio con la diluizione di coniugato di FITC utilizzato per determinare la concentrazione. Il volume di coniugato messo sui pozzetti deve essere identico al volume dell'anticorpo.
- 4.3.5. Mantenere in incubazione i vetrini su carta umida sotto copertura per 30 minuti a temperatura ambiente (18-25 °C).
- 4.3.6. Scuotere via le goccioline di coniugato dal vetrino. Sciacquare e lavare come in precedenza (paragrafo 4.3.3).
- Rimuovere accuratamente l'umidità in eccesso.
- 4.3.7. Trasferire con una pipetta 5-10 µl di glicerolo tamponato al fosfato 0,1 M (Appendice 3) o di un liquido di montaggio commerciale anti-scolorimento in ciascun pozzetto e chiudere con un vetrino coprioggetti.
- 4.4. Lettura della colorazione IF
- 4.4.1. Esaminare i vetrini con un microscopio a epifluorescenza dotato di filtri idonei all'eccitazione del FITC, in olio o liquido di immersione, a 500-1 000 ingrandimenti. Esaminare attentamente i pozzetti lungo due diametri ortogonali e lungo il perimetro. Per i campioni che presentano assenza o un basso numero di cellule, osservare almeno 40 campi microscopici.
- Esaminare anzitutto il vetrino del controllo positivo. Le cellule devono avere fluorescenza brillante ed essere interamente colorate al titolo o alla diluizione di lavoro determinati dell'anticorpo. Il saggio IF (sezione 4) deve essere ripetuto se la colorazione è anomala.
- 4.4.2. Verificare la presenza di cellule fluorescenti brillanti con morfologia caratteristica di *C. m. subsp. sepedonicus* nei pozzetti di saggio dei vetrini (cfr. il sito web <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). L'intensità della fluorescenza deve essere equivalente o maggiore rispetto a quella del ceppo di controllo positivo con la stessa diluizione di anticorpo. Le cellule che presentano una colorazione incompleta o una debole fluorescenza devono essere ignorate.
- In caso di sospetta contaminazione occorre ripetere il saggio. Tale sospetto può sorgere ad esempio se tutti i vetrini di un lotto presentano cellule positive dovute alla contaminazione del tampone o se vengono rilevate cellule positive (al di fuori dei pozzetti) sul rivestimento dei vetrini.
- 4.4.3. La prova di immunofluorescenza presenta alcuni problemi inerenti alla sua specificità. Nei precipitati di coniugati e frammenti di fusto di patata è possibile che si manifesti la presenza di popolazioni di fondo di cellule fluorescenti con morfologia atipica e di batteri saprofiti a reazione incrociata simili per dimensioni e morfologia al *C. m. sepedonicus*.
- 4.4.4. Considerare soltanto le cellule fluorescenti aventi dimensioni e morfologia tipica al titolo o alla diluizione di lavoro degli anticorpi secondo quanto indicato alla sezione 4.3.
- 4.4.5. Interpretazione della lettura della colorazione IF
- i) Per ciascun campione in cui vengono trovate cellule fluorescenti brillanti con morfologia caratteristica, stimare il numero medio di cellule tipiche per campo ottico e calcolare il numero di cellule tipiche per ml di sedimento centrifuga risospeso (Appendice 4).
- La lettura della colorazione IF è positiva per i campioni che presentano almeno 5×10^3 cellule tipiche per ml di sedimento centrifuga risospeso. Il campione si considera potenzialmente contaminato ed occorre procedere ad ulteriori saggi.
- ii) La lettura della colorazione IF è negativa per i campioni che presentano meno di 5×10^3 cellule per ml di sedimento centrifuga risospeso. Il campione si considera negativo e non sono necessari ulteriori saggi.
5. SAGGIO FISH

Principi

Quando il saggio FISH è usato come primo saggio di selezione preliminare e l'esito è positivo, come secondo saggio di selezione preliminare obbligatorio dovrà essere effettuata la colorazione IF. Quando il saggio FISH è usato come secondo saggio di selezione preliminare e l'esito è positivo, per completare la diagnosi devono essere effettuati i saggi previsti dal diagramma di flusso.

▼ **M1***Nota:*

Usare oligosonde convalidate specifiche per *C. m. subsp. sepedonicus* (Appendice 7). Un saggio preliminare con questo metodo dovrebbe permettere il rilevamento riproducibile di almeno 10^3 - 10^4 cellule di *C. m. subsp. sepedonicus* per ml aggiunte a estratti del campione precedentemente risultati negativi.

Il seguente procedimento andrebbe preferibilmente eseguito su estratti di campione preparati al momento dell'uso, ma può avere successo su estratti conservati in glicerolo a una temperatura compresa tra -16 e -24 °C o tra -68 e -86 °C.

Come controllo negativo, usare aliquote di estratto di campione precedentemente risultato negativo per *C. m. subsp. sepedonicus*.

Come controllo positivo preparare sospensioni contenenti 10^5 - 10^6 cellule per ml di *C. m. subsp. sepedonicus* (per esempio ceppo NCPPB 4053 o PD 406) in tampone fosfato 0,01M provenienti da una coltura di 3-5 giorni (per la preparazione cfr. l'appendice 2). Preparare vetrini separati di controllo positivo del ceppo omologo o di qualunque altro ceppo di riferimento di *C. m. subsp. sepedonicus* sospeso in estratto di patata, come specificato nell'appendice 2.

L'uso di un'oligosonda eubatterica marcata con FITC fornisce un controllo per il processo di ibridizzazione per la sua proprietà di colorare tutti gli eubatteri presenti nel campione.

Saggiare il materiale di controllo con lo stesso metodo utilizzato per il/i campione/i.

5.1. **Fissazione dell'estratto da patata**

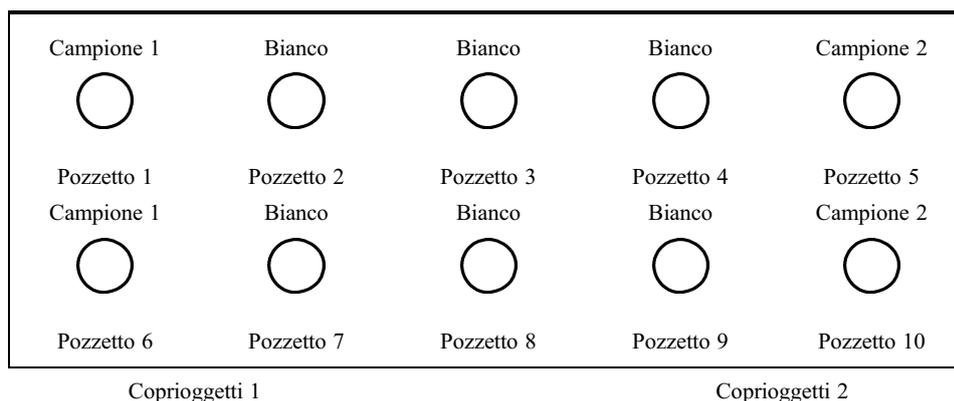
Protocollo secondo Wullings *et al.* (1998):

- 5.1.1. Preparare la soluzione fissativa (Appendice 7).
- 5.1.2. Trasferire con una pipetta 100 µl di ciascun estratto del campione in una provetta Eppendorf e centrifugare per 8 minuti a 7 000 g.
- 5.1.3. Rimuovere il supernatante e sciogliere il precipitato in 500 µl di fissativo preparato meno di 24 ore prima. Mescolare nel vortex e mettere in incubazione per una notte a 4 °C.

In alternativa come fissativo può essere usato etanolo al 96 %. In questo caso, sciogliere il precipitato ottenuto al punto 5.1.2 in 50 µl di tampone fosfato 0,01 M e 50 µl di etanolo al 96 %. Mescolare nel vortex e mettere in incubazione a 4 °C per 30-60 minuti.

- 5.1.4. Centrifugare per 8 minuti a 7 000 g, rimuovere il supernatante e risospendere il precipitato in 75 µl di tampone fosfato 0,01 M (cfr. Appendice 3).
- 5.1.5. Distribuire 16 µl delle sospensioni fissate su un vetrino multitest pulito, come indicato nella figura 3. Applicare 2 diversi campioni per vetrino, non diluiti, e utilizzarne 10 µl per fare una diluizione 1:100 (in tampone fosfato 0,01M). Il resto della soluzione campione (49 µl) può essere conservata a -20 °C previa aggiunta di 1 volume di etanolo al 96 %. Qualora il saggio FISH debba essere ripetuto, rimuovere l'etanolo mediante centrifugazione ed aggiungere un volume equivalente di tampone fosfato 0,01 (mescolare nel vortex).

Figura 3. Schema del vetrino FISH



Coprioggetti 1

Coprioggetti 2

▼ **M1**

- 5.1.6. Far asciugare i vetrini all'aria (o su un essiccatore per vetrini a 37 °C) e fissarli mediante esposizione alla fiamma.

A questo punto il procedimento può essere interrotto e l'ibridazione continuata il giorno successivo. I vetrini devono essere conservati asciutti e al riparo dalla polvere a temperatura ambiente.

5.2. **Preibridazione e ibridazione**

- 5.2.1. Preparare una soluzione di lisozima contenente 10 mg di lisozima (Sigma L-6876) in 10 ml di tampone (100mM Tris-HCl, 50mM EDTA, pH8,0). La soluzione può essere conservata, ma andrebbe congelata/scongelata una sola volta. Coprire bene ciascun campione con circa 50 µl di soluzione di lisozima e porre in incubazione per 10 minuti a temperatura ambiente. Immergere quindi i vetrini una sola volta in acqua demineralizzata e asciugare con carta da filtro.

In alternativa, al posto del lisozima aggiungere a ciascun pozzetto 50 µl di proteinasi K a una concentrazione di 40-400 µg/ml⁻¹ in tampone (20 mM Tris-HCl, 2mM CaCl₂, pH 7,4) e incubare a 37 °C per 30 minuti.

- 5.2.2. Disidratare le cellule in una serie graduata di etanolo (50 %, 80 % e 96 %), un minuto per ciascuna percentuale. Far asciugare i vetrini all'aria in un portavetrini.
- 5.2.3. Preparare una camera di incubazione umida coprendo il fondo di un recipiente chiuso con carta bibula o carta da filtro immersa in 1x hybmix (Appendice 7). Procedere alla preincubazione nel forno di ibridazione a 55 °C per almeno 10 minuti.
- 5.2.4. Preparare la soluzione di ibridazione (Appendice 7) calcolando 45 µl per vetrino e mettere in preincubazione per 5 minuti a 55 °C.
- 5.2.5. Preparare i vetrini su una piastra riscaldante a 45 °C e applicare 10 µl di soluzione di ibridazione su ciascuno dei 4 pozzetti dei vetrini.
- 5.2.6. Applicare 2 coprioggetti (24 × 24 mm) a ciascun vetrino evitando di creare bolle d'aria. Porre i vetrini nella camera umida preriscaldata e far ibridare al buio per una notte nel forno a 55 °C.
- 5.2.7. Preparare 3 becher contenenti 1 l di acqua ultrapura (UPW), 1 l di 1x hybmix (334 ml 3x hybmix e 666 ml UPW) e 1 l di 1/2x hybmix (167 ml 3x hybmix e 833 ml UPW). Preincubare a bagnomaria a 55 °C.
- 5.2.8. Togliere i coprioggetti dai vetrini e porre questi ultimi in un portavetrini.
- 5.2.9. Sciacquare la sonda in eccesso mediante incubazione per 15 minuti nel becher con 1x hybmix a 55 °C.
- 5.2.10. Trasferire il portavetrini in una soluzione di lavaggio costituita da 1/2 hybmix e lasciar incubare per altri 15 minuti.
- 5.2.11. Immergere rapidamente i vetrini in UPW e porli su carta da filtro. Rimuovere l'umidità in eccesso coprendo delicatamente la superficie con carta da filtro. Trasferire con una pipetta 5-10 µl di soluzione di montaggio antiscolorimento (per esempio, Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA o equivalente) su ciascun pozzetto e applicare un largo coprioggetti (24 × 60 mm) sull'intero vetrino.

5.3. **Lettura del saggio FISH**

- 5.3.1. Osservare immediatamente i vetrini con un microscopio predisposto per l'epifluorescenza a 630 o 1000x ingrandimenti in olio da immersione. Con un filtro idoneo per l'isotiocianato di fluoresceina (FITC), le cellule eubatteriche del campione (inclusa la maggior parte delle cellule Gram-negative) appaiono colorate di un verde fluorescente. Usando un filtro per la tetrametilrodamina-5-isotiocianato, le cellule di *C. m. subsp. sepedonicus* marcate con Cy3 appaiono colorate di un rosso fluorescente. Confrontare la morfologia delle cellule con quella dei controlli positivi. Le cellule devono avere fluorescenza brillante ed essere interamente colorate. Il saggio FISH (sezione 9.4) deve essere ripetuto se la colorazione è anomala. Esaminare attentamente i pozzetti lungo due diametri ortogonali e lungo il perimetro. Per i campioni che presentano assenza o un basso numero di cellule, osservare almeno 40 campi microscopici.
- 5.3.2. Verificare la presenza di cellule fluorescenti brillanti con morfologia caratteristica di *C. m. subsp. sepedonicus* nei pozzetti di saggio dei vetrini (cfr. il sito web <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). L'intensità della fluorescenza deve essere equivalente o

▼ **M1**

maggiore rispetto a quella del ceppo di controllo positivo. Le cellule che presentano una colorazione incompleta o una debole fluorescenza devono essere ignorate.

- 5.3.3. In caso di sospetta contaminazione occorre ripetere il saggio. Tale sospetto può sorgere, ad esempio, se tutti i vetrini di un lotto presentano cellule positive dovute alla contaminazione del tampone o se vengono rilevate cellule positive (al di fuori dei pozzetti) sul rivestimento dei vetrini.
- 5.3.4. Il saggio FISH presenta alcuni problemi inerenti alla sua specificità. Nei precipitati di coni ombelicali e frammenti di fusto di patata è possibile che si manifesti, sia pure con minor frequenza rispetto al saggio IF, la presenza di una popolazione di fondo di cellule fluorescenti con morfologia atipica e di batteri saprofiti a reazione incrociata simili per dimensioni e morfologia a *C. m. subsp. sepedonicus*.
- 5.3.5. Considerare soltanto le cellule fluorescenti aventi dimensioni e morfologia tipiche (cfr. punto 5.3.2).
- 5.3.6. Interpretazione del risultato del saggio FISH
- i) I risultati del saggio FISH sono considerati validi quando in tutti i controlli positivi e in nessuno dei controlli negativi si osservano cellule fluorescenti brillanti di colore verde con dimensioni e morfologia caratteristiche di *C. m. subsp. sepedonicus* usando il filtro FITC e cellule fluorescenti brillanti di colore rosso usando il filtro rodamina. Per ciascun campione in cui vengono trovate cellule fluorescenti brillanti con morfologia caratteristica, stimare il numero medio di cellule tipiche per campo ottico e calcolare il numero di cellule tipiche per ml di sedimento centrifuga risospeso (Appendice 4). I campioni che presentano almeno 5×10^3 cellule per ml di sedimento risospeso si considerano potenzialmente contaminate e rendono necessari ulteriori saggi. I campioni che presentano meno di 5×10^3 cellule per ml di sedimento risospeso si considerano negativi.
 - ii) Il saggio FISH è negativo quando, usando il filtro rodamina, non si osservano cellule fluorescenti brillanti di colore rosso con dimensioni e morfologia caratteristiche di *C. m. subsp. sepedonicus*, a condizione che, con lo stesso filtro, tali cellule brillanti tipiche di colore rosso appaiano nei preparati del controllo positivo.
6. SAGGIO PCR

Principi

Quando il saggio PCR è usato come saggio di selezione preliminare principale e l'esito è positivo, occorre procedere alla colorazione IF come secondo saggio di selezione preliminare obbligatorio. Quando il saggio PCR è usato come secondo saggio di selezione preliminare e l'esito è positivo, per completare la diagnosi devono essere effettuati i saggi previsti dal diagramma di flusso.

Si raccomanda di usare questo metodo come saggio di selezione preliminare principale solo dopo aver acquisito una competenza specializzata.

Nota:

Un saggio preliminare con questo metodo dovrebbe permettere il rilevamento riproducibile di 10^3 - 10^4 cellule di *C. m. subsp. sepedonicus* per ml aggiunte a estratti del campione precedentemente risultati negativi. Può essere necessario condurre esperimenti di ottimizzazione per raggiungere livelli massimi di sensibilità e specificità in tutti i laboratori.

Servirsi di protocolli e reagenti PCR convalidati. Scegliere di preferenza un metodo con controllo interno.

Prendere le opportune precauzioni per evitare la contaminazione del campione con il DNA bersaglio. Per ridurre al minimo la possibilità di contaminazione con il DNA bersaglio, il saggio PCR andrebbe eseguito da tecnici esperti, in laboratori di biologia molecolare specializzati.

I controlli negativi (per i procedimenti di estrazione del DNA e PCR) andrebbero sempre trattati come campioni finali nel procedimento, al fine di evidenziare la presenza di eventuali residui di DNA.

Nel saggio PCR devono essere inclusi i seguenti controlli negativi:

▼ **M1**

- estratto del campione precedentemente risultato negativo per *C. m. subsp. Sepedonicus*,
- controlli del tampone usato per estrarre il batterio e il DNA dal campione,
- miscela di reazione PCR.

Devono essere inoltre inclusi i seguenti controlli positivi:

- aliquote del precipitato risospeso a cui è stato aggiunto *C. m. subsp. sepedonicus* (per la preparazione cfr. l'appendice 2),
- una sospensione di 10^6 cellule per ml di *C. m. subsp. sepedonicus* in acqua provenienti da un isolato virulento (per esempio NCPPB 2140 o NCPPB 4053),
- se possibile, nel saggio PCR servirsi anche di DNA proveniente da campioni di controllo positivi.

Per evitare potenziali contaminazioni, preparare i controlli positivi in un ambiente separato da quello dei campioni da saggiare.

Nei limiti del possibile, gli estratti del campione devono essere privi di residui di terra. In taluni casi può essere pertanto consigliabile, in previsione dell'uso di protocolli PRC, preparare le estrazioni a partire da patate lavate.

6.1. **Metodi di purificazione del DNA**

Servirsi di campioni di controllo positivi e negativi, come sopra indicato.

Preparare il materiale di controllo con lo stesso metodo usato per il/i campione/i.

Esistono vari metodi per purificare il DNA bersaglio da substrati di campioni complessi, eliminando in tal modo gli inibitori della PCR e di altre reazioni enzimatiche e concentrando il DNA bersaglio nell'estratto del campione.

Il metodo seguente è stato ottimizzato per l'impiego col metodo PCR convalidato che figura all'appendice 6.

6.1. a) Metodo di Pastrik (2000)

1. Trasferire con una pipetta 220 μ l di tampone di lisi (NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM [pH 8,0], EDTA 1 mM [pH 8,0]) in una provetta Eppendorf da 1,5 ml.
2. Aggiungere 100 μ l di estratto del campione e porre su una piastra riscaldante o a bagnomaria a 95 °C per 10 minuti.
3. Mettere la provetta in ghiaccio per 5 minuti.
4. Aggiungere 80 μ l di soluzione madre di lisozima (50 mg di lisozima per ml in Tris HCl 10 mM, pH 8,0) e incubare a 37 °C per 30 minuti.
5. Aggiungere 220 μ l di Easy DNA[®], soluzione A (Invitrogen), mescolare bene nel vortex e incubare a 65 °C per 30 minuti.
6. Aggiungere 100 μ l di Easy DNA[®], soluzione B (Invitrogen), mescolare vigorosamente nel vortex fino a quando il precipitato non circoli liberamente nella provetta e il campione non presenti una viscosità uniforme.
7. Aggiungere 500 μ l di cloroformio e mescolare nel vortex fino a quando la viscosità non diminuisca e la miscela non risulti omogenea.
8. Centrifugare a 15 000 g per 20 minuti a 4 °C per separare le fasi e formare l'interfase.
9. Trasferire la fase superiore in una nuova provetta Eppendorf.
10. Aggiungere 1 ml di etanolo al 100 % (-20 °C), mescolare brevemente nel vortex e incubare in ghiaccio per 10 minuti.
11. Centrifugare a 15 000 g per 20 minuti a 4 °C ed eliminare l'etanolo dal precipitato.
12. Aggiungere 500 μ l di etanolo all'80 % (-20 °C) e mescolare capovolgendo la provetta.
13. Centrifugare a 15 000 g per 10 minuti a 4 °C, conservare il precipitato ed eliminare l'etanolo.
14. Lasciar seccare il precipitato all'aria o in una Speed vac per DNA.

▼ **M1**

15. Risospendere il precipitato in 100 µl di UPW sterile e lasciare a temperatura ambiente per almeno 20 minuti.
16. Conservare a -20 °C fino al momento di effettuare la PCR.
17. Isolare l'eventuale precipitato bianco mediante centrifugazione e usare 5 µl del supernatante contenente DNA per la PCR.

6.1. b) Altri metodi

È possibile applicare altri metodi di estrazione del DNA (per esempio Qiagen DNeasy Plant Kit), purché essi diano prova di un'efficacia equivalente nel purificare il DNA da campioni di controllo contenenti da 10³ a 10⁴ cellule del patogeno per ml.

6.2. **PCR**

- 6.2.1. Preparare gli stampi per la prova e quelli di controllo secondo il protocollo convalidato (Appendice 6). Preparare una diluizione decimale dell'estratto di DNA proveniente dal campione (1:10 in UPW).
- 6.2.2. Preparare la miscela di reazione PCR in un ambiente indenne da contaminazione secondo il protocollo pubblicato (Appendice 6). Il protocollo PCR convalidato è una reazione multiplex che include anche un controllo interno della PCR.
- 6.2.3. Aggiungere 5 µl di estratto di DNA per 25 µl di miscela di reazione PCR in provette da PCR sterili.
- 6.2.4. Includere un campione di controllo negativo contenente unicamente la miscela di reazione PCR e aggiungere la stessa fonte di UPW utilizzata nella miscela PCR al posto del campione.
- 6.2.5. Porre le provette nello stesso termociclatore utilizzato nei saggi preliminari ed eseguire il programma PCR opportunamente ottimizzato (Appendice 6).

6.3. **Analisi del prodotto della PCR**

- 6.3.1. Separare gli ampliconi della PCR mediante elettroforesi in gel di agarosio. Far correre almeno 12 µl di miscela di reazione del DNA amplificato proveniente da ciascun campione mescolata con 3 µl di tampone di caricamento (Appendice 6) in gel di agarosio al 2,0 % (p/v) in tampone TAE (tris-acetato-EDTA) (Appendice 6) con una tensione di 5-8 V/cm. Usare un marcatore di DNA adeguato, ad esempio un ladder a 100 bp.
- 6.3.2. Visualizzare le bande di DNA mediante colorazione con etidio bromuro (0,5 mg/l) per 30-45 minuti *adottando opportune precauzioni nella manipolazione di questo mutagene*.
- 6.3.3. Osservare il gel colorato con transilluminazione UV a onde corte (per esempio $\lambda = 302$ nm) per individuare prodotti della PCR amplificati delle dimensioni previste (Appendice 6) e documentare i risultati.
- 6.3.4. Per ogni nuovo risultato positivo, verificare l'autenticità dell'amplicone della PCR effettuando un'analisi di restrizione enzimatica su un campione del DNA amplificato rimasto, incubando alla temperatura e per il tempo ottimale con un enzima e un tampone adeguati (cfr. appendice 6). Separare i frammenti digeriti mediante elettroforesi in gel di agarosio come in precedenza, osservare il modello caratteristico di restrizione dei frammenti con transilluminazione UV previa colorazione con etidio bromuro e confrontare con il controllo positivo non digerito e digerito.

Interpretazione del risultato del saggio PCR

Il saggio PCR è negativo se la presenza dell'amplicone PCR delle dimensioni previste, specifico per *C. m. subsp. sepedonicus*, viene evidenziata in tutti i campioni del controllo positivo, ma non nel campione in esame (in caso di PCR multiplex con primer di controllo interno specifici per i vegetali: un secondo prodotto PCR delle dimensioni previste deve essere amplificato con il campione in questione).

Il saggio PCR è positivo se si evidenzia l'amplicone PCR specifico per *C. m. subsp. sepedonicus*, delle dimensioni previste e (ove del caso) con il modello di restrizione caratteristico, a condizione che esso non si manifesti in nessuno dei campioni del controllo negativo. La conferma affidabile di un risultato positivo può essere inoltre ottenuta ripetendo la prova con una seconda serie di primer PCR (sezione 9.3).

▼ **M1***Nota:*

Si può sospettare un'inibizione della PCR se il campione di controllo positivo contenente *C. m. subsp. sepedonicus* in acqua produce l'amplicone previsto, ma i controlli positivi contenenti *C. m. subsp. sepedonicus* in estratto di patata danno risultati negativi. Nei protocolli di PCR multiplex con controlli interni della PCR, l'inibizione della reazione è probabile quando non si ottiene nessuno dei due ampliconi.

Se l'amplicone previsto si manifesta in almeno uno dei controlli negativi si può sospettare una contaminazione.

7. SAGGIO BIOLOGICO

Nota:

Un saggio preliminare svolto con questo metodo deve permettere il rilevamento riproducibile di 10^3 - 10^4 unità formanti colonia di *C. m. subsp. sepedonicus* per ml aggiunte a estratti del campione precedentemente risultati negativi (per la preparazione cfr. l'appendice 2).

Per ottenere la massima sensibilità di rilevamento è preferibile usare estratto del campione preparato al momento e disporre di condizioni di crescita ottimali. Tuttavia, il metodo può avere successo anche su estratti conservati in glicerolo ad una temperatura compresa tra -68 e -86 °C.

Alcune varietà di melanzane costituiscono un ottimo terreno di arricchimento selettivo per la crescita di *C. m. subsp. sepedonicus*, anche in assenza di sintomi, e rappresentano inoltre un eccellente ospite per una prova di conferma.

Le condizioni di crescita devono essere ottimali per ridurre il rischio di falsi negativi.

Per i dettagli relativi alla coltura cfr. l'appendice 8.

- 7.1. Distribuire il resto del quantitativo da saggiare del sedimento risospeso di cui ai precedenti punti 3.1.6 o 3.2.5 tra le melanzane, usando uno dei metodi sotto indicati (7.3 o 7.4). Utilizzare esclusivamente piante allo stadio fogliare 2-3 fino alla piena espansione della terza foglia vera. Per garantire una piena utilizzazione del sedimento risospeso nonché un'effettiva inoculazione, le procedure sotto descritte necessitano 15-25 melanzane per campione.
- 7.2. Prima dell'inoculazione, le melanzane non devono essere innaffiate per uno o due giorni al fine di ridurre il turgore.
- 7.3. Inoculazione per incisione
- 7.3.1. Tenendo la pianta con due dita, versare mediante una pipetta una goccia (5-10 μ l circa) del precipitato sospeso sul fusto tra i cotiledoni e la prima foglia (epicotile).
- 7.3.2. Usando un bisturi sterile, fare un'incisione diagonale lunga circa 1,0 cm e di profondità pari a circa 2/3 dello spessore del fusto. Il taglio deve iniziare al di sotto della goccia di precipitato.
- 7.3.3. Sigillare il taglio con vaselina sterile mediante siringa.
- 7.4. Inoculazione mediante siringa
- Inoculare i fusti di melanzana immediatamente sopra i cotiledoni usando una siringa con ago ipodermico (non inferiore a 23G). Distribuire il campione tra le melanzane.
- 7.5. Come controllo positivo, inoculare in 5 piante una sospensione acquosa di 10^5 - 10^6 cellule per ml di una coltura nota di *C. m. subsp. sepedonicus* e, se possibile, tessuto di tuberi naturalmente contaminati (cfr. sezione 4) con lo stesso metodo di inoculazione (7.3 o 7.4).
- 7.6. Come controllo negativo, inoculare in 5 piante un tampone per sedimento sterile con lo stesso metodo di inoculazione (7.3 o 7.4).
- 7.7. Mantenere le piante in incubazione in locali di quarantena fino a un massimo di 4 settimane a una temperatura compresa tra 18 e 24 °C, con condizioni di luce e acqua sufficienti e un'elevata umidità (70-80 %) per evitare un eccesso d'acqua o un avvizzimento dovuto a carenza d'acqua. Le cellule di *C. m. sepedonicus* non sopravvivono oltre i 30 °C e la temperatura ottimale è di 21 °C. Per evitare la contaminazione, incubare le piante per il controllo positivo e quelle per il controllo negativo su ripiani chiaramente separati all'interno di una serra o di una camera di crescita o, qualora si disponga di uno spazio limitato, garantire una rigida separazione fra i trattamenti. Se le piante usate per diversi campioni sono incubate insieme, separarle con

▼ M1

schermi adeguati. Nel concimare, innaffiare, esaminare ed eseguire ogni altra operazione sulle piante, fare molta attenzione per evitare una contaminazione incrociata. È di fondamentale importanza tenere le serre e le camere di crescita prive di fitofagi, dato che questi ultimi potrebbero trasmettere il batterio da un campione all'altro.

- 7.8. Esaminare le piante periodicamente per vedere se appaiono sintomi, cominciando una settimana dopo l'inoculazione. Contare il numero di piante che manifestano sintomi di infezione. Nelle melanzane il *C. m. subsp. sepedonicus* provoca avvizzimento delle foglie, che può iniziare sotto forma di perdita di turgore di aree lungo il bordo o fra le nervature. Il tessuto con perdita di turgore può apparire inizialmente verde scuro o chiazato, ma si decolora prima di divenire necrotico. La zona con perdita di turgore tra le nervature ha spesso un aspetto idropico. Il tessuto necrotico ha sovente un alone giallo vivo. Le piante non sono sempre portate a morte e, quanto più lungo è il periodo che precede la comparsa dei sintomi, tanto maggiore è la possibilità di sopravvivenza. Le piante possono superare l'infezione. Le piante di melanzane giovani sono molto più sensibili alle basse popolazioni di *C. m. subsp. sepedonicus* rispetto alle piante più vecchie, donde la necessità di usare piante che abbiano raggiunto o stiano per raggiungere lo stadio fogliare 3.

L'avvizzimento delle foglie può anche essere provocato da popolazioni di altri batteri o funghi presenti nel precipitato di tessuto di tubero, fra i quali si annoverano *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* e *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *Erwinia chrysanthemi*, *Phoma exigua* var. *foveata*, nonché ampie popolazioni di batteri saprofiti. In particolare, *Erwinia chrysanthemi* può provocare sintomi fogliari e tipi di avvizzimento molto simili ai sintomi prodotti da *C. m. subsp. sepedonicus*. L'unica differenza è l'annerimento dei fusti nel caso di infezioni da *Erwinia chrysanthemi*. Altri tipi di avvizzimento possono essere distinti da quello provocato dal *C. m. subsp. sepedonicus* in quanto intere foglie o intere piante avvizziscono rapidamente. È anche possibile fare una colorazione di Gram per distinguere *C. m. subsp. sepedonicus* da *Erwinia* spp.

- 7.9. Non appena si osservano sintomi nelle melanzane andrebbe fatto un reisolamento, usando sezioni di tessuto avvizzito di foglie o di fusto delle piante (per la macerazione dei tessuti cfr. il punto 3.1.3). Disinfettare la superficie delle foglie e dei fusti di melanzana strofinandole con etanolo al 70 %. Effettuare un saggio IF o PCR sul succo della melanzana e isolare su un substrato (selettivo) adeguato (cfr. sezione 8). Può essere anche preparata una colorazione di Gram (Appendice 9). Identificare presunte colture purificate di *C. m. subsp. sepedonicus* e confermarne la patogenicità (cfr. sezioni 9 e 10).
- 7.10. In talune circostanze, in particolare quando le condizioni di crescita non sono ottimali, è possibile che l'infezione di *C. m. subsp. sepedonicus* rimanga latente nelle melanzane anche dopo periodi d'incubazione di 4 settimane. Se dopo 4 settimane non si osservano sintomi, procedere a un saggio IF/PCR su un campione multiplo di sezioni di 1 cm di fusto prelevate da ciascuna pianta al di sopra del punto di inoculazione. Se il saggio è positivo, il reisolamento su substrato (selettivo) adeguato deve essere effettuato secondo il procedimento indicato nella sezione 8. Identificare presunte colture purificate di *C. m. subsp. sepedonicus* e confermarne la patogenicità (cfr. sezioni 9 e 10).

Interpretazione dei risultati del saggio biologico

I risultati del saggio biologico possono considerarsi validi se le piante del controllo positivo presentano sintomi tipici, se il batterio può essere reisolato a partire da queste piante e se nessun sintomo viene riscontrato sui controlli negativi.

Il saggio biologico è negativo se le piante inoculate non risultano infettate da *C. m. subsp. sepedonicus* e a condizione che quest'ultimo venga trovato nei controlli positivi.

Il saggio biologico è positivo se le piante inoculate risultano infettate da *C. m. subsp. sepedonicus*.

▼ **M1**8. ISOLAMENTO DI *C. M.* SUBSP. *SEPEDONICUS**Nota:*

La diagnosi può essere completata solo se *C. m.* subsp. *sepedonicus* è isolato, successivamente identificato (cfr. sezione 9) e confermato mediante una prova di patogenicità (sezione 10). Benché si tratti di un organismo difficile da coltivare in vitro, esso può essere isolato a partire da tessuti con sintomi di infezione.

L'isolamento può tuttavia essere ostacolato dalla presenza di batteri saprofiti a crescita rapida; l'isolamento diretto dall'estratto dei tuberi o dei fusti (punti 3.1.6 o 3.2.5) può pertanto risultare difficile. Con un substrato selettivo e un'adeguata diluizione del sedimento risospeso proveniente dai coni ombelicali o dai fusti di patata, l'isolamento diretto di *C. m.* subsp. *sepedonicus* può avere successo.

L'isolamento deve essere effettuato su tutti i tuberi o i segmenti di fusto sintomatici e sulle melanzane che non presentano sintomi, ma che siano risultate positive al saggio IF/PCR condotto sul campione multiplo (cfr. punto 7.10). La macerazione dei fusti delle melanzane deve essere fatta, se del caso, come indicato al punto 3.1.3.

Come controllo positivo, preparare diluizioni decimali di una sospensione di 10^6 cfu per ml di *C. m.* subsp. *sepedonicus* (per esempio NCPPB 4053 o PD 406). Per evitare possibili contaminazioni, preparare i controlli positivi in un ambiente totalmente separato da quello dei campioni da saggiare.

Per ogni nuovo lotto preparato di un substrato selettivo, l'adeguatezza allo sviluppo del patogeno andrebbe verificata prima che il lotto venga usato per saggiare campioni ordinari.

Saggiare il materiale di controllo con lo stesso metodo usato per il/i campione/i.

8.1. **Isolamento selettivo in piastra**

8.1.1. Da un'aliquota di 100 µl proveniente da un campione di sedimento risospeso di patata o di succo di melanzana preparare diluizioni decimali in tampone per sedimento (Appendice 3).

8.1.2. L'isolamento a partire da sedimento di patata non diluito spesso non riesce a causa dell'accentuato fabbisogno di nutrienti da parte di *C. m.* s. e della competizione dei saprofiti. Dato che il batterio è solitamente presente in grandi quantità nei tessuti infetti, la diluizione permette in genere di eliminare i saprofiti conservando una sufficiente presenza del patogeno. Si raccomanda pertanto di inseminare 100 µl di ciascuno dei campioni, in diluizioni da 1:100 a 1:10 000, su substrato MTNA o NCP-88 (Appendice 5), servendosi di spatole a forma di L («hockey sticks») e della tecnica dello striscio su piastra (la quantità indicata è valida per piastre di Petri con un diametro di 90 mm – adeguare il volume se si usano piastre con diametri diversi).

Nota:

Un metodo alternativo consiste nell'inseminare l'aliquota iniziale di 100 µl di sedimento di patata su una prima piastra di agar con l'aiuto di una spatola, trasferire la spatola su una seconda piastra di agar e inseminare per striscio i residui rimasti, ripetendo quindi l'operazione su una terza piastra. La spatola consente in tal modo di ottenere un effetto di diluizione sulle piastre.

8.1.3. Incubare le piastre al buio a una temperatura compresa tra 21 e 23 °C.

8.1.4. Facendo riferimento a quelle di controllo, un primo esame delle piastre, fatto conteggiando le colonie di aspetto simile a *C. m.* subsp. *sepedonicus*, deve aver luogo dopo 3 giorni, con ulteriori conteggi dopo 5, 7 ed eventualmente 10 giorni.

8.2. **Purificazione di colonie sospette***Nota:*

Per l'inoculazione di melanzane e/o la successiva identificazione, le subcolture di colonie di aspetto simile a *C. m.* subsp. *sepedonicus* devono essere allevate su substrato YGM. Questa selezione va fatta prima che le colture in piastra siano troppo sviluppate, ossia preferibilmente dopo 3-5 giorni.

8.2.1. Inseminare per striscio le colonie di aspetto simile a *C. m.* subsp. *sepedonicus* su uno dei seguenti terreni di coltura (le formule figurano nell'appendice 5):

agar nutritivo con destrosio (solo per le subcolture);

▼ **M1**

agar con lievito, peptone e glucosio;

agar con estratto di lievito e sali minerali.

Mantenere in incubazione a 21-24 °C per un massimo di 10 giorni.

Il *C. m.* subsp. *sepedonicum* cresce lentamente, producendo di solito colonie puntiformi a cupola di color bianco panna entro 10 giorni. (Foto a colori di colonie tipiche di *C. m.* subsp. *sepedonicus* sono disponibili sul sito web <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

8.2.2. Inseminare di nuovo per striscio piastre per ottenere colonie pure.

I tassi di crescita sono migliori con le subcolture. Le colonie tipiche sono di color bianco panna o avorio, occasionalmente gialle, di forma circolare ad elevazione convessa, liscia, di consistenza viscoso-fluida, con margine intero e un diametro di 1-3 mm.

Una semplice colorazione di Gram (Appendice 9) può essere utile per selezionare le colonie in vista di ulteriori saggi.

8.2.3. Identificare le presunte colonie (cfr. sezione 9) ed effettuare un saggio di patogenicità (cfr. sezione 10).

9. IDENTIFICAZIONE

Identificare le colture pure di presunti isolati di *C. m.* subsp. *sepedonicus* usando almeno due dei saggi seguenti, basati su principi biologici diversi.

Se necessario, per ciascun saggio che viene fatto includere ceppi di riferimento noti.

9.1. **Saggi di identificazione nutrizionali ed enzimatici**

Determinare le seguenti proprietà fenotipiche, sistematicamente presenti o assenti in *C. m.* subsp. *sepedonicus*, secondo i metodi di Lelliott e Stead (1987), Klement *et al.* (1990), Schaad (2001), anonimo (1987).

Tutti i terreni di coltura andrebbero messi in incubazione a 21 °C ed esaminati dopo 6 giorni. Se non c'è stata alcuna crescita, incubare fino a 20 giorni.

Ciascun saggio deve comprendere un campione noto di *C. m.* subsp. *sepedonicus* come controllo. I saggi nutrizionali e fisiologici devono essere fatti usando inoculo preso da subcolture su agar nutritivo. I confronti morfologici devono essere fatti a partire da colture su agar nutritivo con destrosio.

<i>Prova</i>	<i>Risultato atteso</i>
Metabolismo del glucosio (O/F)	Inerte o debolmente ossidativo
Attività ossidasica	–
Crescita a 37 °C	–
Attività ureasica	–
Idrolisi dell'esculina	+
Idrolisi dell'amido	– o debole
Tolleranza ad una soluzione di NaCl al 7 %	–
Produzione di indolo	–
Attività catalasica	+
Produzione di H ₂ S	–
Utilizzazione del citrato	–
Liquefazione della gelatina	–
Acidità da glicerolo	–
Acidità da lattosio	– o debole
Acidità da ramnosio	–
Acidità da salicina	–
Colorazione di Gram (Appendice 9)	+

▼ **M1**

- 9.2. **Saggio IF**
- Preparare una sospensione di circa 10^6 cellule per ml in tampone IF (Appendice 3).
 - Preparare una serie di diluizioni 1:2 di un antisiero adeguato.
 - Applicare il procedimento IF (sezione 4).
 - Il risultato del saggio è positivo se il titolo IF della coltura in esame è equivalente a quello del controllo positivo.
- 9.3. **Saggio PCR**
- Preparare una sospensione di circa 10^6 cellule per ml in acqua ultrapura (UPW).
 - Riscaldare 100 μ l della sospensione di cellule in provette chiuse su una piastra riscaldante o a bagnomaria a 100 °C per 4 minuti. Se necessario, l'aggiunta di NaOH preparato al momento a una concentrazione finale di 0,05M può favorire la lisi cellulare. I campioni possono quindi essere conservati a una temperatura compresa tra -16 e -24 °C fino al momento d'uso.
 - Usare protocolli PCR adeguati per amplificare gli ampliconi specifici per *C. m. subsp. sepedonicus* (per esempio Pastrik, 2000; vedere appendice 4; Li e de Boer, 1995; Mills *et al.*, 1997; Pastrik e Rainey, 1999; Schaad *et al.*, 1999).
 - L'identificazione di *C. m. subsp. sepedonicus* è positiva se gli ampliconi della PCR presentano le stesse dimensioni e gli stessi polimorfismi di restrizione dei frammenti che si osservano nel ceppo di controllo positivo.
- 9.4. **Saggio FISH**
- Preparare una sospensione di circa 10^6 cellule per ml in tampone UPW.
 - Applicare il procedimento FISH (sezione 5).
 - Il risultato del saggio FISH è positivo se si ottengono le stesse reazioni sia nella coltura che nel controllo positivo.
- 9.5. **Profilo degli acidi grassi (FAP)**
- Far crescere la coltura in esame su triptone-soia-agar (Oxoid) per 72 ore a 21 °C (+/-1°).
 - Usare un protocollo FAP di tipo adeguato (Janse, 1991; Stead, 1992b).
 - Il saggio FAP è positivo se il profilo della coltura in esame è identico a quello del controllo positivo. La presenza degli acidi grassi caratteristici 15:1 Anteiso A, 15:0 Iso, 15:0 Anteiso, 16:0 Iso, 16:0 e 17:0 Anteiso è altamente indicativa della presenza di *C. m. sepedonicus*. Altri generi come *Curtobacterium*, *Arthrobacter* e *Micrococcus* presentano a loro volta alcuni di questi acidi, ma l'Anteiso A 15:1 è un acido raro in questi batteri, mentre è presente in tutti quelli della specie *Clavibacter* in percentuale compresa tra l'1 e il 5 %. In *C. m. sepedonicus* questo valore si aggira in genere intorno al 5 %.
- 9.6. **BOX-PCR**
- Preparare una sospensione di circa 10^6 cellule per ml in tampone UPW.
 - Applicare il saggio secondo il protocollo (Smith *et al.*, 2001).
10. **SAGGIO DI CONFERMA**
- La prova di patogenicità deve essere effettuata come conferma finale di una diagnosi di *C. m. subsp. sepedonicus* e per valutare la virulenza delle colture identificate come *C. m. subsp. sepedonicus*.
- 10.1. Preparare un inoculo di circa 10^6 cellule per ml da colture di 3 giorni dell'isolato da saggiare e da un ceppo di controllo positivo di *C. m. subsp. sepedonicus*.
- 10.2. Inoculare 5-10 fusti di piantine di melanzana allo stadio fogliare 3 (sezione 7.3 o 7.4).
- 10.3. Mantenere in incubazione a 18-24 °C con condizioni di luce sufficienti e ad alta umidità relativa, innaffiando adeguatamente per evitare un eccesso di acqua o uno stress dovuto alla siccità (sezione 7.7). Nel caso di colture pure il tipico avvizzimento dovrebbe manifestarsi entro 2 settimane, ma le piante che non mostrano sintomi (cfr. sezione 7.8) una volta trascorso questo periodo dovrebbero essere mantenute in

▼ **M1**

incubazione per un totale di 3 settimane a temperature che permettano la crescita delle melanzane, ma che non siano superiori a 25 °C (Appendice 8). Trascorse 3 settimane, se non si manifestano sintomi di infezione, non è possibile confermare che la coltura sia una forma patogena di *C. m. subsp. sepedonicus*.

- 10.4. Isolare da ciascuna pianta sintomatica una sezione di fusto prelevata 2 cm al di sopra del punto di inoculazione. Sminuzzarla e sospenderla in una piccola quantità di acqua distillata sterile o in tampone fosfato 50 mM (Appendice 3). Isolare dalla sospensione mediante insemamento a striscio su piastre di MTNA e YPGA (Appendice 5), incubare per 3–5 giorni a una temperatura compresa tra 21 e 23 °C e osservare il formarsi di colonie tipiche di *C. m. subsp. sepedonicus*.

▼ **M1***Appendice 1***Laboratori coinvolti nell'ottimizzazione e nella convalida dei protocolli**

Laboratorio ⁽¹⁾	Ubicazione	Paese
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Vienna e Linz	Austria
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Belgio
Plantedirektoratet	Lyngby	Danimarca
Central Science Laboratory	York	Inghilterra
Scottish Agricultural Science Agency	Edimburgo	Scozia
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	Francia
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Francia
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Germania
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Germania
State Laboratory	Dublino	Irlanda
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Paesi Bassi
Norwegian Crop Research Institute, Plant Protection Centre	Aas	Norvegia
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lisbona	Portogallo
Nacionalni institut za biologijo	Lubiana	Slovenia
Centro de Diagnóstico de Aldearrubia	Salamanca	Spagna

⁽¹⁾ Per prendere contatto con i ricercatori cfr. il sito web <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

▼ **M1***Appendice 2***Preparazione di controlli positivi e negativi per i saggi principali di selezione preliminare PCR/IF e FISH**

Preparare una coltura di 72 ore di un ceppo virulento di *C. m. subsp. sepedonicus* [NCPPB 4053 o PD 406] sul terreno nutritivo di base MTNA e sospendere in tampone fosfato 10 mM per ottenere una densità cellulare di circa $1-2 \times 10^8$ cfu/ml. Questa concentrazione corrisponde ad una sospensione lievemente torbida avente una densità ottica da 0,20 a 600 nm.

Asportare il cono ombelicale di 200 tuberi provenienti da una varietà a buccia bianca in cui sia stata accertata assenza di *C. m. subsp. sepedonicus*.

Trattare i coni ombelicali come di consueto e risospesare il sedimento in 10 ml.

Preparare 10 microprovette sterili da 1,5 ml con 900 µl del sedimento risospeso.

Trasferire 100 µl della sospensione di *C. m. subsp. sepedonicus* nella prima microprovetta. Mescolare nel vortex.

Stabilire livelli decimali di contaminazione mediante ulteriori diluizioni nelle altre cinque microprovette.

Le sei microprovette contaminate verranno usate come controlli positivi. Le quattro microprovette non contaminate verranno usate come controlli negativi. Etichettare le microprovette di conseguenza.

Preparare aliquote di 100 µl in microprovette sterili da 1,5 ml, ottenendo così 9 copie di ciascun campione di controllo. Conservare a una temperatura compresa fra -16 e -24 °C fino all'uso.

La presenza e la quantificazione di *C. m. subsp. sepedonicus* nei campioni di controllo deve essere in primo luogo confermata dal saggio IF.

Per il saggio PCR procedere all'estrazione del DNA dai campioni di controllo positivi e negativi per ciascuna serie di campioni da saggiare.

Per i saggi IF e FISH fare saggi sui campioni di controllo positivi e negativi per ciascuna serie di campioni da saggiare.

Per i saggi IF, FISH e PCR la presenza di *C. m. subsp. sepedonicus* deve essere rilevata in almeno 10^6 e 10^4 cellule/ml dei controlli positivi e non deve essere rilevata in nessuno dei controlli negativi.

▼ **M1**

Appendice 3

Tamponi per l'esecuzione dei protocolli

INDICAZIONE GENERALE: i tamponi sterilizzati non aperti possono essere conservati fino a un anno.

1. Tamponi per procedura di estrazione**1.1. Tampone di estrazione (tampone fosfato 50 mM, pH 7,0)**

Questo tampone è usato per l'estrazione del batterio dai tessuti vegetali mediante omogeneizzazione o agitazione.

Na ₂ HPO ₄ (anidro)	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
Acqua distillata	1,00 l

Disciogliere gli ingredienti, controllare il pH e sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 min.

Possono risultare utili i seguenti componenti supplementari:

	Finalità	Quantità (per l)
Lubrol in scaglie	Deflocculante (*)	0,5 g
Antischiuma al silicone DC	Antischiumogeno (*)	1,0 ml
Pirofosfato tetrasodico	Antiossidante	1,0 g
Polivinilpirrolidone-40 000 (PVP-40)	Legame con gli inibitori della PCR	50 g

(*) Da usare con il metodo di estrazione per omogeneizzazione

1.2. Tampone per sedimento (tampone fosfato 10 mM, pH 7,2)

Questo tampone è impiegato per riportare in sospensione e diluire l'estratto di coni ombelicali di patate concentrato in sedimento mediante centrifugazione.

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

Disciogliere gli ingredienti, controllare il pH e sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 min.

2. Tamponi per il saggio IF**2.1. Tampone IF: soluzione fisiologica tamponata al fosfato (PBS) 10 mM, pH 7,2**

Questo tampone viene impiegato per la diluizione degli anticorpi.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,4 g
NaCl	8,0 g
Acqua distillata	1,00 l

Disciogliere gli ingredienti, controllare il pH e sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 min.

2.2. Tampone IF - Tween

Questo tampone è usato per lavare i vetrini.

Aggiungere lo 0,1 % di Tween 20 al tampone IF.

2.3. Glicerolo tamponato al fosfato, pH 7,6

Questo tampone viene impiegato come liquido di montaggio sui pozzetti dei vetrini IF per incrementare la fluorescenza.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	3,2 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,15 g
Glicerolo	50 ml
Acqua distillata	100 ml

▼ **M1**

Soluzioni di montaggio antiscolorimento sono disponibili in commercio, ad esempio Vectashield® (Laboratori Vector) o Citifluor® (Leica).

▼ **M1***Appendice 4***Determinazione del livello di contaminazione nei saggi IF e FISH**

1. Conteggiare il numero medio di cellule IF tipiche per campo microscopico (c).
2. Calcolare il numero di cellule IF tipiche per pozzetto di vetrino da microscopio (C).

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

in cui S = superficie del pozzetto del vetrino multiplo e

s = superficie del campo dell'obiettivo

$s = \pi i^2 / 4G^2K^2$ in cui i) = coefficiente di campo (dipende dal tipo di oculare e varia fra 8 e 24)

K = coefficiente del microscopio (1 o 1,25)

G = ingrandimento dell'obiettivo (100x, 40x, ecc.)

3. Calcolare il numero di cellule IF tipiche per ml di precipitato riportato in sospensione (N).

$$N = C \times 1000/y \times F$$

in cui y = volume del precipitato risospeso, depositato su ciascun pozzetto e

F = fattore di diluizione del precipitato risospeso.

▼ **M1**

Appendice 5

Terreni nutritivi per l'isolamento e la coltura di *C. m. subsp. sepedonicus*a) *Terreni nutritivi generali*

Agar nutritivo (NA)

Agar nutritivo (Difco)	23,0 g
Acqua distillata	1,00 l

Disciogliere gli ingredienti e sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 min.

Agar nutritivo al destrosio (NDA)

Bacto-agar nutritivo (Difco) contenente l'1 % di D(+) glucosio (monoidrato).
Sterilizzare in autoclave a 115 °C per 20 minuti.

Lievito peptone glucosio agar (YPGA)

Estratto di lievito (Difco)	5,0 g
Bacto-peptone (Difco)	5,0 g
D(+) glucosio (monoidrato)	10,0 g
Bacto-agar (Difco)	15,0 g
Acqua distillata	1,00 l

Disciogliere gli ingredienti e sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Terreno di coltura all'estratto di lievito e ai sali minerali (YGM)

Bacto-estratto di lievito (Difco)	2,0 g
D(+) glucosio (monoidrato)	2,5 g
K ₂ HPO ₄	0,25 g
KH ₂ PO ₄	0,25 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,015 g
NaCl	0,05 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,005 g
Bacto-agar (Difco)	18 g
Acqua distillata	1,00 l

Disciogliere gli ingredienti e sterilizzare volumi di mezzo litro di terreno di coltura in autoclave a 115 °C per 20 minuti.

b) *Terreni di coltura selettivi convalidati*

Terreno di coltura MTNA

Salvo altrimenti specificato, tutti i componenti dei terreni di coltura provengono dalla BDH.

Estratto di lievito (Difco)	2,0 g
Mannitolo	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 (Oxoid n. 1)	16,0 g
Acqua distillata	1,00 l

Disciogliere gli ingredienti e regolare il pH a 7,2. Dopo aver sterilizzato in autoclave (a 121 °C per 15 minuti) e fatto raffreddare a 50 °C, aggiungere gli antibiotici: 0,06 g di trimetoprim (Sigma), 0,002 g di acido nalidissico, 0,001 g di amfotericina B.

▼ M1

Soluzioni madre di antibiotici: trimetoprim (Sigma) e acido nalidissico (Sigma) (entrambi a 5 mg/ml), in metanolo al 96 %, amfotericina B (Sigma) (1 mg/ml) in dimetil solfossido. Le soluzioni madre sono sterilizzate a filtro.

Nota:

Il mezzo di coltura basale si conserva per 3 mesi. Dopo aver aggiunto gli antibiotici, la conservazione è di 1 mese in regime di refrigerazione.

Terreno di coltura NCP-88

Agar nutritivo (Difco)	23 g
Estratto di lievito (Difco)	2 g
D-mannitolo	5 g
K ₂ HPO ₄	2 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g
Acqua distillata	1,00 l

Disciogliere gli ingredienti e regolare il pH a 7,2. Dopo aver sterilizzato in autoclave e raffreddato a 50 °C aggiungere i seguenti antibiotici: 0,003 g di polymyxin B solfato (Sigma), 0,008 g di acido nalidixico (Sigma), 0,2 g di cicloesamide (Sigma).

Disciogliere gli antibiotici nelle soluzioni madre come segue: acido nalidissico in NaOH a 0,01 M, cicloeximide in etanolo al 50 %, polymyxin B solfato in acqua distillata. Le soluzioni madre sono sterilizzate a filtro.

Nota:

Il mezzo di coltura basale si conserva per 3 mesi. Dopo aver aggiunto gli antibiotici, la conservazione è di 1 mese in regime di refrigerazione.

▼ M1

Appendice 6

Protocollo e reagenti PCR convalidati

Nota:

I saggi preliminari dovrebbero consentire il rilevamento riproducibile di almeno 10^3 - 10^4 cellule di *C. m. sepedonicus* per ml di estratto del campione.

I saggi preliminari, inoltre, non dovrebbero presentare falsi positivi in una serie di ceppi batterici selezionati.

1. Protocollo PCR multiplex con controllo interno della PCR (Patrik, 2000)

1.1. Primer oligonucleotidici

Forward primer PSA-1 5'- ctc ctt gtg ggg tgg gaa aa -3'

Reverse primer PSA-R 5'- tac tga gat gtt tca ctt ccc c -3'

Forward primer NS-7-F 5'- gag gca ata aca ggt ctg tga tgc -3'

Reverse primer NS-8-R 5'- tcc gca ggt tca cct acg ga -3'

Dimensioni attese degli ampliconi del DNA stampo di *C. m. subsp. sepedonicus* = 502 bp (set di primer PSA)

Dimensioni attese degli ampliconi del controllo interno PCR 18S rRNA = 377 bp (set di primer NS)

1.2. Miscela di reazione PCR

Reagenti	Quantità per reazione	Concentrazione finale
UPW sterile	15,725 µl	
10x tampone PCR ⁽¹⁾ (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1x (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (frazione V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
miscela d-nTP (20mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer PSA-1 (10µM)	0,5 µl	0,2 µM
Primer PSA-1 (10µM)	0,5 µl	0,2 µM
Primer NS-7-F (10µM) ⁽²⁾	0,1 µl	0,04 µM
Primer NS-8-R (10µM) ⁽²⁾	0,1 µl	0,04 µM
⁽¹⁾ Taq polimerasi (5U/µl) ¹	0,2 µl	1,0 U
Volume del campione	5,0 µl	
Volume totale:	25,0 µl	

⁽¹⁾ I metodi sono stati convalidati usando *Taq* polimerasi di Perkin Elmer (AmpliQ[®] o Gold) e Gibco BRL.

⁽²⁾ Le concentrazioni dei primer NS-7 F and NS-8-R sono state ottimizzate per l'estrazione dei coni ombelicali usando il metodo di omogeneizzazione e la purificazione del DNA secondo Patrik (2000) [cfr. sezioni 6.1.a) e 6.2]. Sarà necessario riottimizzare le concentrazioni dei reagenti se sono impiegati metodi di estrazione mediante agitazione o altri metodi di isolamento del DNA.

1.3. Condizioni di reazione della PCR

Eeguire il seguente programma:

1 ciclo di:	i)	3 minuti a 95 °C (denaturazione del DNA stampo)
10 cicli di:	ii)	1 minuto a 95 °C (denaturazione del DNA stampo)
	iii)	1 minuto a 64 °C (appaiamento dei primer)
	iv)	1 minuto a 72 °C (estensione della copia)
25 cicli di:	v)	30 secondi a 95 °C (denaturazione del DNA stampo)
	vi)	30 secondi a 62 °C (appaiamento dei primer)
	vii)	1 minuto a 72 °C (estensione della copia)
1 ciclo di:	viii)	5 minuti a 72 °C (estensione finale)

▼ **M1**

ix) mantenere a 4 °C.

Nota:

Questo programma è ottimizzato per l'impiego con un termociclatore MJ Research PTC 200. Qualora vengano utilizzati altri modelli potrà essere necessario modificare la durata delle fasi ii), iii), iv), v), vi) e vii).

1.4. *Analisi di restrizione enzimatica degli ampliconi*

I prodotti della PCR amplificati a partire dal DNA di *C. m. subsp. sepedonicus* producono uno specifico polimorfismo della lunghezza del frammento di restrizione con l'enzima *Bgl* II dopo essere stati incubati a 37 °C per 30 minuti. I frammenti di restrizione ottenuti dal frammento specifico di *C. m. subsp. sepedonicus* hanno dimensioni di 282 bp e 220 bp.

2. **Preparazione del tampone di caricamento**2.1. *Blu di bromofenolo (soluzione madre al 10 %)*

Blu di bromofenolo	5 g
Acqua distillata (bidistillata)	50 ml

2.2. *Tampone di caricamento*

Glicerolo (86 %)	3,5 ml
Blu di bromofenolo (5,1)	300 µl
Acqua distillata (bidistillata)	6,2 ml

3. **10X tampone triacetato EDTA (TAE), pH 8,0**

Tampone triacetato	48,4 g
Acido acetico glaciale	11,42 ml
EDTA (sale disodico)	3,72 g
Acqua distillata	1,00 l

Diluire a 1X prima dell'impiego.

Disponibile anche in commercio (ad esempio Invitrogen o equivalente).

▼ **M1**

Appendice 7

Reagenti convalidati per il saggio FISH**1. Oligosonde**

Sonda specifica per *C.m.s.* CMS-CY3-01: 5'- ttg cgg ggc gca cat ctc tgc acg - 3'

Sonda eubatterica non specifica EUB-338-FITC: 5'- gct gcc tcc cgt agg agt-3'

2. Soluzione fissativa

[ATTENZIONE! IL FISSATIVO CONTIENE PARAFORMALDEIDE, CHE È TOSSICA. INDOSSARE GUANTI E NON INALARE. SI CONSIGLIA DI LAVORARE SOTTO CAPP A CHIMICA]

i) Riscaldare 9 ml di acqua molecolare (ad esempio acqua ultrapura - UPW) a circa 60 °C e aggiungere 0,4 g di paraformaldeide. La paraformaldeide si scioglie aggiungendo 5 gocce di NaOH 1N e mescolando con un agitatore magnetico.

ii) Regolare il pH a 7,0 aggiungendo 1 ml di tampone fosfato 0,1 M (PB; pH 7,0) e 5 gocce di HCl 1N. Controllare il pH con cartine indicatrici e, se necessario, regolare con HCl o NaOH.

[ATTENZIONE! NON UTILIZZARE PH-METRO PER SOLUZIONI CONTENENTI PARAFORMALDEIDE]

iii) Filtrare la soluzione attraverso un filtro membrana da 0,22 µm e conservare al riparo dalla polvere a 4 °C fino all'utilizzo successivo.

iv) *Nota:*

Soluzione fissativa alternativa: etanolo al 96 %.

3. 3x Hybmix

NaCl 2,7 M
Tris-HCl 60 mM (pH 7,4)
EDTA (sterilizzato per filtrazione e autoclavato) 15 mM

Diluire a 1x come prescritto.

4. Soluzione di ibridazione

1x Hybmix

Sodio dodecil solfato (SDS) 0,01 %

Sonda EUB 338 5 ng/µl

Sonda CMSCY301 5 ng/µl

Preparare quantità di soluzione d'ibridazione secondo i calcoli di cui alla tabella 1. Per ciascun vetrino (contenente 2 campioni diversi in duplicato) sono necessari 90 µl di soluzione di ibridazione.

Tabella: Quantità consigliate per la preparazione della miscela di ibridazione.

	2 vetrini	8 vetrini
UPW sterile	50,1	200,4
3x Hybmix	30,0	120,0
1 % SDS	0,9	3,6
Sonda EUB 338 (100 ng/µl)	4,5	18,0
Sonda CMSCY 301 (100 ng/µl)	4,5	18,0
Volume totale (µl)	90,0	360,0

NB: Conservare al buio a una temperatura di -20 °C tutte le soluzioni contenenti oligosonde sensibili alla luce. Durante l'impiego proteggere dalla luce solare diretta o dalla luce elettrica.

5. Tampone fosfato 0,1M, pH 7,0

Na₂HPO₄ 8,52 g

▼ M1

KH_2PO_4 5,44 g

Acqua distillata 1,00 l

Disciogliere gli ingredienti, controllare il pH e sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

▼ **M1***Appendice 8***Condizioni di coltura per le melanzane**

Seminare i semi di melanzana (*Solanum melongena*) in terra da semina pastorizzata. Trapiantare le piantine con cotiledoni completamente sviluppati (10-14 giorni) in terra da vaso pastorizzata.

Le melanzane dovrebbero essere coltivate in una serra nelle seguenti condizioni ambientali:

Luce: 14 ore o lunghezza naturale del giorno se maggiore;

Temperatura: diurna: da 21 a 24 °C,
notturna: 15 °C.

Varietà di melanzana sensibili: «Black Beauty»,
«Long Tom»,
«Rima»,
«Balsas».

Fornitore: cfr. il sito web <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

▼ **M1***Appendice 9***Procedura per la colorazione di Gram (modifica di Hucker) (Doetsch, 1981) ⁽¹⁾***Soluzione di cristalvioletto*

Sciogliere 2 g di cristalvioletto in 20 ml di etanolo al 95 %.

Sciogliere 0,8 g di ossalato di ammonio in 80 ml di acqua distillata.

Mescolare le due soluzioni.

Soluzione di Lugol

Iodio	1 g
Ioduro di potassio	2 g
Acqua distillata	300 ml

Polverizzare insieme i cristalli in un mortaio con il pestello e discioglierli in poche gocce d'acqua. Aggiungere l'acqua restante, mescolare bene e mettere la soluzione in una bottiglia di vetro con tappo.

Soluzione per colorazione alla safranina

Soluzione madre:

Safranina O	2,5 g
etanolo al 95 %	100 ml

Mescolare e mettere da parte.

Diluire in proporzione 1:10 per ottenere una soluzione di lavoro.

Procedimento di colorazione

1. Preparare gli strisci, farli asciugare all'aria e fissarli passandoli sul dardo della fiamma del Bunsen.
2. Coprire il vetrino con la soluzione al cristalvioletto per un minuto.
3. Lavare rapidamente con acqua corrente.
4. Coprire il vetrino con la soluzione di Lugol per un minuto.
5. Lavare con acqua corrente e asciugare tamponando con carta bibula.
6. Decolorare con etanolo al 95 %, aggiungendolo goccia a goccia finché non si verifica più alcuna decolorazione, oppure immergendovi lo striscio e scuotendo con cautela per 30 secondi.
7. Lavare con acqua corrente e asciugare tamponando con carta bibula.
8. Coprire il vetrino con la soluzione di safranina per 10 secondi.
9. Lavare con acqua corrente e asciugare tamponando con carta bibula.

I batteri Gram-positivi si colorano di blu-violetto, quelli Gram-negativi di rosa-rosso.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Anonimo, 1987. Scheme of the detection and diagnosis of the ring rot bacterium *Corynebacterium sepedonicum* in batches of potato tubers. Commissione delle Comunità europee, Lussemburgo. Publ. EUR 11 288 EN, 21 pp.
2. Bradbury, J.F., 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. Rev. Pl. Pathol., 49, 213-218.
3. Dinesen, I.G., 1984. The extraction and diagnosis of *Corynebacterium sepedonicum* from diseased potato tubers. EPPO Bull. 14 (2), 147-152.
4. Doetsch, R.N., 1981. Determinative methods of light microscopy. In: Manual of methods for general bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, 21-23.
5. Hugh, R. and Leifson, E., 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. J. Bact., 66, 24-26.

⁽¹⁾ Si possono usare anche soluzioni disponibili in commercio e kit per la colorazione.

▼ M1

6. Janse, J.D., 1991. Infra- and intraspecific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty acid analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 14; 335-345.
7. Janse, J.D. and J. Van Vaerenbergh, 1987. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (*Corynebacterium sepedonicum*) in potato. *EPPO Bull.*, No 17, 1987, pp. 1-10.
8. Jansing, H. and K. Rudolph, 1998. Physiological capabilities of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* and development of a semi-selective medium. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 105, 590-601.
9. Kovacs, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*, Lond., 178, 703.
10. Klement Z., Rudolph, K. and D.C. Sands, 1990. *Methods in Phytobacteriology*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 pp.
11. Lelliott, R.A., 1966. The plant pathogenic coryneform bacteria. *J. appl. Bact.*, 29, 114-118.
12. Lelliott, R.A., Billing, E. and Hayward, A.C., 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *J. appl. Bact.*, 30, 114-118.
13. Lelliott, R.A., and Sellar, P.W., 1976. The detection of latent ring rot [*Corynebacterium sepedonicum* (Spiek. et Kotth.) Skapt. et Burkh.] in potato stocks. *EPPO Bull.*, 6 (2), 101-106.
14. Li, X. and S.H. de Boer, 1995. Selection of Polymerase Chain Reaction primers from RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. *Phytopathology*, 85, 837-842.
15. Mills, D., Russell, B., W. and J., W. Hanus, 1997. Specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* by amplification of three unique DNA sequences isolated by subtraction hybridization. *Phytopathology*, 87, (8), 853-861.
16. Pstrik, K.-H. and R.A. Rainey. 1999. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. *J. Phytopathology* 147; 687-693.
17. Pstrik, K.-H., 2000. Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. *European Journal of Plant Pathology*, 106, 155-165.
18. Ramamurthi, C.S., 1959. Comparative studies on some Gram-positive phytopathogenic bacteria and their relationship to the Corynebacteria. *Mem. Cornell agric. Exp. Sta.*, 366, 52 pp.
19. Schaad, W., Berthier-Schaad, Y., Sechler, A. and Knorr, D. (1999) Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system. *Plant Disease* 83; 1095-1100.
20. Schaad, W. 2001. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. Schaad [Hrsg.]. - 3. ed.; St. Paul, Minnesota.; 373 pp.
21. Skerman, V. B. D., 1967. *A guide to the identification of the genera of bacteria*. 2nd ed., William and Wilkins Company, Baltimore.
22. Smith, N.C.; Hennessy, J.; Stead, D.E., 2001. Repetitive sequence-derived PCR profiling using the BOX-A1 *Ralstonia solanacearum* primer for rapid identification of plant pathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. *European Journal of Plant Pathology*, 107 (7), 739-748.
23. Sneath, P.H.A. and Collins, V.G., 1974. A study in test reproductibility between laboratories: report of Pseudomonas working party. *Antonie van Leeuwenhoek*, 40, 481-527.
24. Stead, D.E., 1992b. Grouping of plant pathogenic and some other Pseudomonas spp. using cellular fatty acid profiles. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42; 281-295.
25. Wullings, B.A., Van Beuningen, A., Janse, J.D. and A.D.L. Akkermans, 1998. Detection of *Ralstonia solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent *in situ* hybridization with 23s rRNA-targeted probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4546-4554.

▼ **M1***ALLEGATO II*

1. Per ogni caso sospetto per cui sia stato rilevato un risultato positivo nel saggio/nei saggi di selezione preliminare secondo i metodi di cui all'allegato I, e per cui si attenda la conferma o la smentita attraverso i suddetti metodi, è necessario mantenere e conservare in condizioni adeguate:

- tutti i campioni di tuberi e, ove possibile, tutti i campioni di piante,
- ogni estratto residuo ed ogni materiale supplementare (ad esempio, vetrini di immunofluorescenza) preparato in vista dei saggi di selezione preliminare,

e

- tutta la documentazione pertinente

fino al termine delle prove condotte secondo i suddetti metodi.

La conservazione dei tuberi consentirà di effettuare, ove necessario, prove varietali.

2. Qualora venga confermata la presenza dell'organismo nocivo, è necessario mantenere e conservare in condizioni adeguate:

- il materiale di cui al paragrafo 1,
- un campione conservato del materiale di melanzana infetto inoculato con l'estratto di tubero o di pianta,

e

- la coltura isolata dell'organismo nocivo

per almeno un mese dalla notifica di cui all'articolo 5, paragrafo 2, della direttiva.

▼ M1

ALLEGATO III

1. Per determinare l'entità della contaminazione probabile di cui all'articolo 5, paragrafo 1, lettera b), della direttiva, è necessario tenere conto dei seguenti elementi:
 - tuberi o piante coltivati in un luogo di produzione dichiarato contaminato ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a),
 - luoghi di produzione associati al ciclo produttivo dei tuberi o delle piante dichiarati contaminati ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), compresi quelli dove vengono condivisi macchinari e dispositivi di produzione indirettamente o attraverso un imprenditore comune,
 - tuberi o piante prodotti nel luogo o nei luoghi di produzione di cui al precedente trattino, o presenti in tali luoghi di produzione nel periodo in cui i tuberi o le piante dichiarati contaminati ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), erano presenti nelle imprese o nei luoghi di produzione di cui al primo trattino,
 - locali adibiti alla manipolazione di patate provenienti dai luoghi di produzione di cui ai trattini precedenti,
 - macchinari, veicoli, contenitori, magazzini, o relative parti, e qualsiasi altro oggetto, compresi i materiali d'imballaggio, che possano essere venuti a contatto con i tuberi o le piante dichiarati contaminati ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a),
 - tuberi o piante immagazzinati o entrati in contatto con una qualsiasi delle strutture o degli oggetti elencati nel precedente trattino prima della pulizia o della disinfezione di tali strutture o oggetti,
 - dopo le prove di cui all'articolo 6, tuberi o piante con una relazione clonale parentale o collaterale con tuberi o piante dichiarati contaminati ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), e per i quali, malgrado i risultati negativi nei saggi per l'individuazione dell'organismo nocivo, la contaminazione risulti probabile per legami di carattere clonale (per verificare l'identità di tuberi o piante contaminati ed aventi una tale relazione clonale può essere effettuata un'analisi della varietà),
 - luoghi di produzione di tuberi o piante di cui al precedente trattino.
2. Per determinare la potenziale disseminazione di cui all'articolo 5, paragrafo 1, lettera c), della presente direttiva, è necessario tenere conto dei seguenti elementi:
 - la vicinanza di altri luoghi di produzione della patata o di altre piante ospiti dell'organismo nocivo,
 - produzione e uso comuni di scorte di tuberi-seme di patate.
3. La notifica prevista all'articolo 5, paragrafo 2, primo comma, è effettuata come segue:
 - non appena la presenza dell'organismo nocivo è stata confermata da prove di laboratorio che impiegano i metodi di cui all'allegato I, indicare almeno:
 - la varietà della partita di patate,
 - il tipo (da consumo, da semina, ecc.) e, se del caso, la categoria dei tuberi-seme di patate,
 - ove sussista un rischio di contaminazione di patate provenienti da o dirette in altri Stati membri lo Stato membro in cui tale evento è stato confermato informa immediatamente gli Stati membri interessati fornendo le informazioni che consentano loro di rispettare l'articolo 5, paragrafo 3, ossia:
 - la varietà della partita di patate,
 - il nominativo e l'indirizzo dell'esportatore e del destinatario,
 - la data di consegna della partita di patate,
 - le dimensioni della partita di patate consegnata,
 - una copia del passaporto delle piante o all'occorrenza almeno il numero dello stesso ovvero, se opportuno, il numero di registrazione del coltivatore e del grossista e una copia dell'avviso di consegna.

La Commissione va informata immediatamente dell'avvenuta trasmissione di tali informazioni.

 - Una volta concluse le indagini, indicare per ogni caso:
 - la data di conferma della contaminazione,
 - una breve descrizione dell'indagine effettuata per identificare la fonte e la possibile diffusione della contaminazione, incluso il livello del campionamento effettuato,

▼ M1

- informazioni sulla fonte o le fonti identificate o presunte della contaminazione,
- dati sull'estensione della contaminazione dichiarata, compreso il numero di luoghi di produzione e il numero di partite, con l'indicazione della varietà e, nel caso dei tuberi-seme di patate, della categoria,
- particolari relativi alla delimitazione della zona, incluso il numero di luoghi di produzione non dichiarati contaminati, ma compresi nella zona,
- ogni altra informazione eventualmente richiesta dalla Commissione sulla confermata comparsa della malattia.

▼ **M1***ALLEGATO IV*

1. Gli interventi soggetti a controllo ufficiale di cui all'articolo 7, paragrafo 1, sono:
 - impiego per l'alimentazione animale, previo idoneo trattamento termico tale che non sussista alcun rischio di sopravvivenza dell'organismo nocivo,
 - ovvero
 - smaltimento in un sito apposito, ufficialmente approvato e destinato a tale scopo, in cui non siano identificabili rischi di dispersione dell'organismo nell'ambiente, ad esempio in seguito ad infiltrazione del terreno agricolo,
 - ovvero
 - incenerimento,
 - ovvero
 - destinazione alla trasformazione industriale, attraverso la consegna diretta e immediata a uno stabilimento dotato di strutture ufficialmente approvate per l'eliminazione dei rifiuti che escludano qualsiasi rischio identificabile di disseminazione dell'organismo nocivo e provvisto di dispositivi per la pulizia e la disinfezione quanto meno dei veicoli in uscita,
 - ovvero
 - altri interventi, sempreché sia stato accertato che non esiste alcun rischio effettivo di disseminazione dell'organismo nocivo; tali interventi, debitamente motivati, vengono notificati alla Commissione e agli altri Stati membri.

Qualsiasi materiale di rifiuto associato alle alternative sopra descritte e nell'ambito delle stesse prodotto verrà eliminato secondo metodi ufficialmente approvati a norma di quanto disposto nell'allegato VII della presente direttiva.
2. L'uso o l'eliminazione appropriati dei tuberi o delle piante dichiarati probabilmente contaminati ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera b), di cui all'articolo 7, paragrafo 2, da effettuarsi sotto il controllo degli organismi ufficiali competenti dello Stato o degli Stati membri interessati, prevedendo uno scambio di informazioni fra gli organismi ufficiali tale da assicurare l'applicazione costante di tale controllo nonché l'approvazione da parte degli organismi ufficiali competenti degli Stati membri in cui le patate sono imballate o trattate in relazione agli impianti destinati all'eliminazione dei rifiuti di cui al primo e secondo trattino, comprendono:
 - l'impiego come patate da consumo, in imballaggi pronti per la consegna diretta e l'utilizzo senza necessità di riconfezionamento, in uno stabilimento dotato degli idonei impianti di eliminazione dei rifiuti; le patate destinate alla piantagione possono essere manipolate presso lo stesso stabilimento solo se tale operazione avviene separatamente dalla manipolazione delle patate da consumo o previa pulizia e disinfezione,
 - o
 - l'impiego come patate da consumo destinate alla trasformazione industriale e consegnate direttamente e immediatamente ad uno stabilimento dotato di strutture apposite per l'eliminazione dei rifiuti e di un dispositivo per la pulizia e la disinfezione almeno dei veicoli in uscita,
 - altri impieghi o forme di eliminazione, sempre che sia accertato che non esiste alcun rischio identificabile di disseminazione dell'organismo nocivo, e fatta salva l'approvazione degli organismi ufficiali competenti di cui sopra.
3. I metodi adeguati di pulizia e disinfezione degli oggetti di cui all'articolo 7, paragrafo 3, sono quelli che escludono qualsiasi rischio identificabile di disseminazione dell'organismo nocivo e che vengono applicati sotto il controllo degli organismi ufficiali responsabili degli Stati membri.
4. La serie d'interventi che gli Stati membri attuano nella zona delimitata ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera c), e di cui all'articolo 7, paragrafo 4, della presente direttiva, comprende quanto segue:
 - 4.1. nei luoghi di produzione dichiarati contaminati ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a):
 - a) in un appezzamento dichiarato contaminato ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a):

▼ **M1**

- i) — per almeno i tre anni vegetativi successivi a quello in cui la contaminazione è stata dichiarata:
 - si attuano interventi intesi ad eliminare le piante di patate spontanee e altre piante ospiti naturali dell'organismo nocivo,
 - è vietato mettere a dimora tuberi, piante o semi di patata propriamente detti o altre piante ospiti naturali dell'organismo nocivo o colture per le quali sussiste un rischio effettivo di sopravvivenza o di disseminazione di detto organismo,
 - nel primo periodo di raccolta delle patate che segue il periodo indicato al trattino precedente e a condizione che il terreno sia risultato esente da piante spontanee di patata e da altre piante ospiti naturali dell'organismo nocivo nel corso di ispezioni ufficiali per almeno due anni vegetativi consecutivi precedenti alla messa a dimora, è autorizzata soltanto la produzione di patate da consumo e i tuberi, dopo il raccolto, sono controllati secondo la procedura descritta nell'allegato I,
 - nel periodo di raccolta delle patate che segue quello indicato al trattino precedente e applicando un ciclo di rotazione idoneo, della durata di almeno due anni laddove si tratti di mettere a dimora patate da semina, possono essere messe a dimora patate per la produzione di patate da semina o da consumo e viene effettuato un accertamento ufficiale come indicato all'articolo 2, paragrafo 1, oppure
- ii) — nei quattro anni vegetativi successivi a quello in cui la contaminazione è stata dichiarata:
 - si attuano interventi intesi ad eliminare le piante di patate spontanee e altre piante ospiti naturali dell'organismo nocivo,
 - l'appezzamento viene messo e tenuto a maggese completo oppure a pascolo permanente e si effettuano frequenti falciature a raso oppure l'appezzamento viene adibito a pascolo intensivo,
 - nel primo periodo di raccolta delle patate che segue il periodo indicato al trattino precedente e a condizione che il terreno sia risultato esente da piante spontanee di patata e da altre piante ospiti naturali dell'organismo nocivo nel corso di ispezioni ufficiali per almeno due anni vegetativi consecutivi precedenti alla messa a dimora, è autorizzata la produzione di patate da semina o da consumo e i tuberi, dopo il raccolto, sono controllati secondo la procedura descritta nell'allegato I;
- b) in tutti gli altri appezzamenti del luogo di produzione contaminato e a condizione che gli organismi ufficiali competenti siano convinti che il rischio derivante da piante spontanee di patate e da altre piante ospiti naturali dell'organismo nocivo sia stato eliminato:
 - nella stagione vegetativa successiva a quella in cui la contaminazione è stata dichiarata è vietato mettere a dimora tuberi, piante o semi di patata propriamente detti o altre piante ospiti naturali dell'organismo nocivo, oppure
 - possono venir messi a dimora tuberi-seme di patate certificati unicamente per la produzione di patate da consumo,
 - nella seconda stagione vegetativa successiva a quella in cui la contaminazione è stata dichiarata sono messi a dimora per la produzione di patate da semina o da consumo unicamente patate da seme certificate o tuberi-seme di patate ufficialmente sottoposti ad analisi per accertare l'assenza di marciume anulare e coltivati sotto sorveglianza ufficiale in luoghi di produzione diversi da quelli indicati al punto 4.1,
 - per almeno la terza stagione vegetativa successiva a quella in cui la contaminazione è stata dichiarata sono messi a dimora per la produzione di patate da semina o da consumo unicamente tuberiseme di patate certificati o tuberi-seme di patate coltivati sotto sorveglianza ufficiale da tuberi-seme di patate certificati,
 - in ciascuna delle stagioni vegetative di cui ai trattini precedenti si prendono provvedimenti per eliminare le piante spontanee di patata e le altre piante ospiti naturali dell'organismo nocivo eventualmente presenti; in ogni appezzamento di patate vengono inoltre effettuati sulle patate raccolte controlli ufficiali secondo la procedura descritta nell'allegato I;

▼ **M1**

- c) non appena avvenuta la dichiarazione di contaminazione ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), e dopo la prima stagione vegetativa successiva, tutti i macchinari e le strutture di magazzino presenti sul luogo di produzione e associati al ciclo produttivo delle patate sono opportunamente puliti e disinfettati con i metodi adeguati conformemente al punto 3;
- d) in un'unità di produzione protetta del vegetale dove è possibile la sostituzione completa del substrato colturale:
- è vietato mettere a dimora tuberi, piante o semi propriamente detti a meno che l'unità di produzione sia stata sottoposta a interventi sotto controllo ufficiale diretti ad eliminare l'organismo nocivo ed a rimuovere tutto il materiale vegetale delle piante ospiti, compresi almeno il cambiamento completo del substrato colturale e la pulizia e la disinfezione dell'unità di produzione e di tutte le attrezzature, e purché gli organismi ufficiali responsabili abbiano successivamente autorizzato la produzione di patate,
 - la produzione di patate si effettua a partire da tuberi-seme di patate certificati o da minituberi o piantine ottenuti da fonti controllate;
- 4.2. all'interno della zona delimitata, fatti salvi gli interventi previsti al punto 4.1, gli Stati membri:
- a) non appena è avvenuta la dichiarazione di contaminazione, provvedono affinché tutti i macchinari e le strutture di magazzino presenti nelle imprese ed impiegati nella produzione di patate siano opportunamente puliti e disinfettati con metodi appropriati conformemente al punto 3;
- b) non appena è avvenuta la dichiarazione di contaminazione e per almeno tre stagioni vegetative:
- garantiscono il controllo, attraverso i propri organismi ufficiali responsabili, delle imprese dove viene effettuata la coltivazione, il magazzino o la manipolazione dei tuberi di patata, nonché delle imprese che gestiscono, su base contrattuale, i macchinari occorrenti,
 - esigono l'impiego esclusivo di patate da seme certificate o tuberi-seme coltivati sotto controllo ufficiale per tutte le colture di patata comprese in tale zona, e l'esecuzione di analisi dopo il raccolto di tuberi-seme di patate coltivati in luoghi di produzione dichiarati probabilmente contaminati ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera b),
 - prescrivono che la manipolazione delle patate da semina raccolte sia separata da quella delle patate da consumo in tutte le imprese della zona oppure che la pulizia e la disinfezione siano effettuate tra la manipolazione delle patate da semina e quella delle patate da consumo,
 - effettuano gli accertamenti ufficiali di cui all'articolo 2, paragrafo 1;
- c) stabiliscono se necessario un programma volto a sostituire tutte le scorte di tuberi-seme nell'arco di un opportuno periodo di tempo.

▼ **M1***ALLEGATO V*

I metodi ufficialmente approvati di eliminazione dei rifiuti di cui all'allegato IV, paragrafo 1 si uniformano alle disposizioni seguenti in modo da escludere qualsiasi rischio identificabile di disseminazione dell'organismo nocivo:

- i) i rifiuti di patate (inclusi le bucce di patata come pure le patate scartate nonché ogni altro rifiuto solido associato alle patate (inclusi terreno, pietre ed altri detriti) verranno eliminati avvalendosi di una delle seguenti alternative:
 - smaltimento in un sito apposito, ufficialmente approvato e destinato a tale scopo, in cui non siano identificabili rischi di dispersione dell'organismo nell'ambiente, ad esempio in seguito ad infiltrazione del terreno agricolo. Il trasporto dei rifiuti in tale sito va effettuato servendosi di contenitori idonei ad eliminare ogni rischio di perdita dei rifiuti stessi;
 - incenerimento;
 - altri interventi, sempreché sia stato accertato che non esiste alcun rischio effettivo di disseminazione dell'organismo nocivo; tali interventi, debitamente motivati, vengono notificati alla Commissione e agli altri Stati membri;
- ii) rifiuti liquidi: prima dell'eliminazione i rifiuti liquidi che contengano materiale solido in sospensione vanno sottoposti a procedimenti di filtraggio o decantazione per rimuovere il materiale solido in questione, per la cui eliminazione si applicano le disposizioni di cui al precedente sottoparagrafo i).

Fatto questo i rifiuti liquidi vengono:

- riscaldati fino ad una temperatura uniforme minima di 60 °C per almeno 30 minuti e successivamente eliminati, ovvero
- eliminati in altri modi ufficialmente approvati e soggetti a controlli ufficiali tali da garantire che non sussistano rischi identificabili di dispersione dell'organismo nell'ambiente, ad esempio in seguito ad infiltrazione del terreno agricolo. I relativi particolari vengono notificati alla Commissione e agli altri Stati membri.

Le alternative descritte nel presente allegato valgono parimenti per i rifiuti associati alla manipolazione, allo smaltimento ed alla lavorazione di lotti di prodotto contaminati.