

ASSEMBLEIA LEGISLATIVA DA REGIÃO AUTÓNOMA DOS AÇORES

ADMITIDO, NUMERE-SE E  
PUBLIQUE-SE PRESIDÊNCIA DO CONSELHO DE MINISTROS

Baixa à Comissão: *Gabinete do Secretário de Estado da Presidência do Conselho de Ministros*

*Economia*

Para parecer até, *2 / 5 / 07*  
*12 / 4 / 07*

O Presidente,

*[Signature]*

000642 10.ABR.2007



*A Lessas*

Exmo. Senhor.  
Chefe do Gabinete do Presidente da  
Assembleia Legislativa da Região  
Autónoma dos Açores

Encarrega-me o Senhor Secretário de Estado da Presidência do Conselho de Ministros de remeter para a audição prevista no n.º 2 do artigo 229.º da Constituição e no artigo 8º do Estatuto Político-Administrativo da Região Autónoma dos Açores, os seguintes projectos de diploma:

- Projecto de Decreto-Lei que estabelece as medidas de controlo fitossanitário a adoptar em relação à bactéria *Clavibacter michiganensis (Smith) Davis et al. ssp. sepedonicus (Spieckerman et Kottoff) Davis et al.*, causadora da podridão anelar da batateira, transpondo para a ordem jurídica interna a Directiva n.º 2006/56/CE, da Comissão, de 12 de Junho de 2006, que altera os anexos da Directiva n.º 93/85/CEE, do Conselho, de 4 de Outubro, relativa à luta contra a podridão anelar da batateira - **Reg. DL 268/2007**
- Projecto de Decreto-Lei que estabelece as medidas de controlo fitossanitário a adoptar em relação à bactéria *Ralstonia solanacearum (Smith) Yabuuchi et al.*, causadora da doença do pus ou mal murcho da batateira e do mal murcho tomateiro, transpondo para a ordem jurídica interna a Directiva n.º 2006/63/CE, da Comissão, de 14 de Julho de 2006, que altera os anexos II a VII da Directiva n.º 98/57/CE, do Conselho, de 20 de Julho relativa ao controlo de *Ralstonia solanacearum (Smith) Yabuuchi et al* - **Reg. DL 269/2007**

De acordo com o disposto no n.º 2 do artigo 23º do Regimento do Conselho de Ministros do XVII Governo Constitucional e no cumprimento do n.º 1 do artigo 80º do Estatuto Político-Administrativo da Região Autónoma dos Açores, solicita-se a emissão de parecer até ao dia 30 de Abril de 2007.

Com os melhores cumprimentos,

O Chefe do Gabinete

*F. A.*

Francisco André

ASSEMBLEIA LEGISLATIVA DA  
REGIÃO AUTÓNOMA DOS AÇORES  
ARQUIVO

Entrada *1092* Proc. Nº *08-06*

Data: *07, 04, 07* Nº *184, VIII*

## **DL 268/2007**

A doença provocada pelo agente patogénico *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis *et al.* ssp. *sepedonicus* (Spieckerman et Kottoff) Davis *et al.*, vulgarmente designada por podridão anelar da batata, é um factor de redução da produção da cultura da batateira e representa um risco para esta cultura não só no País como também em todo o território comunitário, se não forem tomadas medidas de protecção fitossanitária eficazes.

Tornou-se, pois, necessário estabelecer medidas de controlo fitossanitário destinadas a evitar a introdução e a dispersão daquele organismo patogénico no território nacional, competindo, para o efeito à Direcção Geral da Agricultura e Desenvolvimento Rural, a definição, a elaboração, coordenação e aplicação do programa nacional de prospecção do organismo prejudicial.

Neste contexto, foi publicada a Portaria n.º 140/95, de 9 de Fevereiro, que aprovou as medidas fitossanitárias destinadas a evitar a introdução e a propagação daquele agente patogénico no território nacional e definiu os procedimentos a adoptar para a implementação do referido programa, através nomeadamente de disposições técnicas quanto à foma de conservação das amostras testadas e rastreabilidade do organismo prejudicial, transpondo a Directiva n.º 93/85/CEE, do Conselho, de 4 de Outubro, relativa à luta contra a podridão anelar da batateira.

Foi, entretanto, publicada a Directiva n.º 2006/56/CE, da Comissão, de 12 de Junho, que veio alterar os anexos da Directiva n.º 93/85/CEE, do Conselho, de 4 de Outubro. Estes anexos foram substancialmente alterados, quer para fazer face aos avanços significativos em termos da compreensão da biologia, dos procedimentos de detecção e de identificação do agente patogénico, quer para enquadrar a experiência obtida na luta contra aquele organismo prejudicial através da revisão de várias disposições técnicas relacionadas com as medidas de controlo.

No tocante aos procedimentos de detecção e de identificação, foram introduzidos procedimentos recentemente desenvolvidos como a hibridação fluorescente *in situ* (FISH) e a reacção em cadeia da polimerase (PCR), bem como melhorias nos diversos métodos laboratoriais a utilizar.

Quanto aos elementos técnicos das medidas de controlo, introduzem-se disposições que permitem melhorar a forma de conservação das amostras testadas, no sentido de assegurar a rastreabilidade do organismo prejudicial, a reunião dos elementos necessários para determinar a dimensão provável da contaminação, os pormenores da comunicação de qualquer presença confirmada do organismo prejudicial e da zona contaminada relevante e a aplicação das medidas em locais de produção designados como contaminados e no interior das zonas demarcadas.

Deste modo, face à obrigatoriedade de proceder à transposição Directiva n.º 2006/56/CE, da Comissão, de 12 de Junho, aliada ao facto de ser necessário actualizar, por um lado, não só todo o regime específico de medidas fitossanitárias aplicáveis mas, também, as referências aos serviços oficiais com competências na matéria, e por outro, enquadrar tais disposições com o actual regime fitossanitário aprovado pelo Decreto-Lei n.º 154/2005, de 6 de Setembro, importa que se opte por publicar um decreto-lei que comporte a consolidação legislativa de toda a matéria em apreço.

Assim:

Nos termos da alínea *a)* do n.º 1 do artigo 198.º da Constituição, o Governo decreta o seguinte:

## CAPÍTULO I

### Disposições gerais

#### Artigo 1.º

##### Transposição de directivas

O presente decreto-lei transpõe para a ordem jurídica interna a Directiva n.º 2006/56/CE, da Comissão, de 12 de Junho, que altera os anexos da Directiva n.º 93/85/CEE, do Conselho, de 4 de Outubro, relativa à luta contra a podridão anelar da batateira, procedendo, simultaneamente, à consolidação legislativa da transposição de ambas as directivas.

#### Artigo 2.º

##### Objecto

1 — O presente decreto-lei estabelece as medidas de controlo fitossanitário a adoptar em relação à bactéria *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis *et al.* ssp. *sepedonicus* (Spieckerman *et* Kottoff) Davis *et al.*, causadora da podridão anelar da batateira, a seguir designada por «organismo prejudicial», no sentido de evitar o seu aparecimento e uma vez detectada, localizá-la e determinar a sua distribuição, evitar a sua dispersão e combatê-la com vista à sua eventual erradicação.

2 — O disposto no presente decreto-lei é aplicável, sem prejuízo do disposto no Decreto-Lei n.º 154/2005, de 6 de Setembro, na redacção que lhe foi dada pelo Decreto-Lei n.º 193/2006, de 26 de Setembro, que actualiza o regime fitossanitário que cria e define as medidas de protecção fitossanitária destinadas a evitar a introdução e dispersão no território nacional e comunitário, incluindo nas zonas protegidas, de organismos

prejudiciais aos vegetais e produtos vegetais qualquer que seja a sua origem ou proveniência.

## CAPÍTULO II

### Controlo do organismo prejudicial

#### Artigo 3.º

##### Prospecção oficial

1 — Para efeitos do disposto no n.º 1 do artigo anterior, a Direcção-Geral da Agricultura e Desenvolvimento Rural (DGADR) define, elabora e coordena a aplicação do programa nacional de prospecção do organismo prejudicial, cuja execução se realiza anualmente.

2 — A execução do programa de prospecção referido no número anterior cabe aos serviços de inspecção fitossanitária das direcções regionais de agricultura e pescas (DRAP) e dos correspondentes organismos das Regiões Autónomas dos Açores e da Madeira, nas respectivas áreas de actuação.

3 — As prospecções previstas no programa nacional, incidem obrigatoriamente sobre tubérculos e, sempre que apropriado, em plantas de batateira de *Solanum tuberosum* L., sendo que:

- a) Quando se tratar de tubérculos, são colhidas amostras tanto de batata-semente, como de outras batatas, de preferência provenientes de lotes em armazém, que são submetidas a testes laboratoriais oficiais, ou realizados sob controlo oficial, utilizando o método para a detecção e diagnóstico do organismo prejudicial referido no número seguinte, podendo, se adequado, ser efectuada uma inspecção visual oficial, ou oficialmente controlada, através de corte de tubérculos noutras amostras;
- b) Quando se tratar de plantas, estas prospecções são efectuadas segundo métodos adequados e as amostras são submetidas a testes laboratoriais de acordo com o disposto no número seguinte.

4 — O método de diagnóstico, detecção e identificação do organismo prejudicial nos tubérculos é o referido no anexo I ao presente decreto-lei do qual faz parte integrante, devendo ser utilizado, para as plantas de batateira, qualquer outro método adequado oficial ou oficialmente controlado.

5 — A DGADR deve comunicar anualmente a Comissão Europeia e os demais Estados membros, dos resultados da execução do programa nacional de prospecção do organismo prejudicial.

#### Artigo 4.º

##### Dever de informação em relação ao organismo prejudicial

Qualquer pessoa que saiba ou suspeite da presença do organismo prejudicial em plantas de batateira e ou em tubérculos colhidos, armazenados ou comercializados no território nacional, deve informar de imediato os serviços de inspeção fitossanitária das DRAP ou a DGADR.

#### Artigo 5.º

##### Procedimentos no caso de suspeita da presença do organismo prejudicial

1 — Considera-se estar perante uma ocorrência suspeita quando a confirmação da presença do organismo prejudicial se tenha verificado por meio de:

- a) Observação de sintomas visuais de diagnóstico suspeito da doença; ou
- b) Obtenção de um resultado positivo num teste de imunofluorescência, através de uma leitura positiva num teste de rastreio confirmada por um resultado positivo num segundo teste de rastreio apropriado (PCR/FISH), tal como consta do anexo I.

2 — Em caso de ocorrência suspeita, os serviços de inspeção fitossanitária da DRAP competente devem:

- a) Assegurar a realização de testes laboratoriais oficiais ou oficialmente controlados, conforme previsto no n.º 4 do artigo 3.º, de acordo com as condições definidas no n.º 1 do anexo II ao presente decreto-lei do qual faz parte integrante, a fim de confirmar ou refutar a ocorrência suspeita;
- b) Proibir a utilização e a circulação de todos os lotes ou remessas dos quais tenham sido colhidas amostras, excepto sob o seu controlo e desde que se tenha concluído que não existe qualquer risco identificável de dispersão do organismo prejudicial;
- c) Adoptar medidas adicionais a fim de determinar a origem da ocorrência suspeita e evitar a dispersão do organismo prejudicial.

#### Artigo 6.º

##### Procedimentos no caso de confirmação da presença do organismo prejudicial

1 — Sempre que a presença do organismo prejudicial seja confirmada através dos testes laboratoriais referidos no n.º 4 do artigo 3.º, os serviços de inspecção fitossanitária da DRAP competente devem:

- a) Zelar pelo cumprimento dos procedimentos estabelecidos no n.º 2 do anexo II;
- b) Declarar contaminados os tubérculos e ou plantas de batateira, as remessas e ou lotes, a maquinaria, os veículos, os navios, os armazéns ou respectivas partes e quaisquer outros objectos, incluindo material de embalagem, em que tiver sido colhida a amostra e, quando adequado, o local ou locais de produção e os campos onde tiverem sido colhidos os tubérculos ou as plantas de batateira;
- c) Determinar, na sequência da declaração de contaminação dos tubérculos ou plantas de batateira, a realização de testes laboratoriais de acordo com o disposto no n.º 4 do artigo 3.º, nos lotes de batata com uma relação clonal com a batata infectada, sendo que os testes são realizados no número de tubérculos ou plantas necessário para

determinar a provável fonte primária de infecção e a extensão da contaminação provável, de preferência por ordem do grau de risco;

d) Determinar, tendo em conta o disposto no n.º 1 do anexo III ao presente decreto-lei do qual faz parte integrante, a extensão da contaminação provável por contacto pré ou pós colheita ou por relação de produção com a contaminação declarada;

e) Demarcar uma zona, com base na declaração de contaminação, na determinação da extensão da contaminação provável e na possível dispersão do organismo prejudicial, tendo em conta o disposto no n.º 2 do anexo III.

2 — A DGADR deve comunicar à Comissão Europeia e aos outros Estados membros de qualquer contaminação declarada e dos pormenores respeitantes à demarcação da zona.

3 — A comunicação referida no número anterior, deve ser efectuada nos termos do disposto no n.º 3 do anexo III.

### Artigo 7.º

#### Medidas de protecção fitossanitária subsequentes

1 — Os tubérculos e ou as plantas de batateira declarados contaminados, não podem ser plantados e sob controlo dos serviços de inspecção fitossanitária da DRAP competente, são:

a) Destruídos;

b) Eliminados de outro modo, de acordo com medidas oficialmente controladas, nos termos do n.º 1 do anexo IV e do anexo V ao presente decreto-lei do qual fazem parte integrante, desde que se tenha concluído não existir qualquer risco identificável de dispersão do organismo prejudicial.

2 — Os tubérculos e ou as plantas de batateira considerados provavelmente contaminados, não podem ser plantados e, sem prejuízo do resultados dos testes referidos na alínea c) do n.º 1 do artigo anterior, para os lotes de batata com relação clonal, são, sob controlo dos serviços de inspecção fitossanitária da DRAP competente,



alvo de utilização ou eliminação adequados, nos termos especificados no n.º 2 do anexo IV, e em condições que garantam a inexistência de qualquer risco identificável de dispersão do organismo prejudicial.

3 — Toda a maquinaria, os veículos, os navios, os armazéns ou respectivas partes e quaisquer outros objectos, incluindo o material de embalagem, declarados contaminados ou considerados provavelmente contaminados, são destruídos ou limpos e desinfectados segundo métodos adequados, como especificado no n.º 3 do anexo IV, sendo que após a desinfectação esses objectos deixam de ser considerados contaminados.

4 — Sem prejuízo das medidas aplicadas nos termos dos números anteriores, na zona demarcada são, também, aplicadas as medidas especificadas no n.º 4 do anexo IV.

5 — Só é permitida a plantação de batata-semente desde que:

*a)* Sejam satisfeitas as exigências estabelecidas no Decreto-Lei n.º 154/2005, de 6 de Setembro;

*b)* A batata seja proveniente, em linha directa, de material obtido no âmbito de um programa oficialmente aprovado, que tenha sido declarado isento do organismo prejudicial em testes oficiais, ou controlados oficialmente, utilizando o método previsto no n.º 4 do artigo 3.º

6 — Os testes referidos na alínea *b)* do número anterior, devem ser realizados:

*a)* Quando a contaminação afectar a produção de batata-semente, nas plantas da selecção clonal inicial,

*b)* Nos restantes casos, tanto nas plantas da selecção clonal inicial como em amostras representativas de batata-semente de base ou de material de multiplicação anterior.

#### Artigo 8.º

#### Notificação das medidas fitossanitárias

As medidas de protecção fitossanitária determinadas e mandadas aplicar, são objecto de notificações oficiais emanadas das DRAP, dirigidas às pessoas singulares e colectivas envolvidas.

#### Artigo 9.º

##### Encargos dos operadores económicos

Os encargos resultantes da aplicação das medidas de protecção fitossanitária referidas no número anterior, são suportados pelos respectivos operadores económicos.

#### Artigo 10.º

##### Proibição

É proibida a posse e manuseamento do organismo prejudicial.

#### Artigo 11.º

##### Derrogações

Para fins experimentais ou científicos e trabalhos de selecção varietal, a DGADR pode autorizar a não execução do disposto na alínea c) do n.º 1 do artigo 6.º, nos n.ºs 1 a 4 do artigo 7.º e no artigo 10.º, para efeitos de aplicação do Decreto-Lei n.º 91/98, de 14 de Abril, que estabelece as condições pelas quais determinados organismos prejudiciais, vegetais, produtos vegetais e outros materiais podem ser introduzidos ou circular na Comunidade, ou em zonas protegidas, para fins experimentais ou científicos e trabalhos de selecção de variedades.

### CAPÍTULO III

#### Regime contra-ordenacional

#### Artigo 12.º

##### Contra-ordenações

1 — As seguintes infracções constituem contra-ordenações puníveis com coima cujo montante mínimo é de € 100 e máximo de € 3740 ou mínimo de € 250 e máximo de € 44890, consoante o agente seja pessoa singular ou colectiva:

- a) A omissão do dever de informação previsto no artigo 4.º;
- b) O não cumprimento das medidas de protecção fitossanitária determinadas e mandadas aplicar ao abrigo do artigo 8.º e em violação do disposto nos artigos 5.º e 7.º;
- c) O não cumprimento dos encargos financeiros resultantes da aplicação das medidas de protecção fitossanitária aplicar ao abrigo do artigo 8.º, em violação do disposto no artigo 9.º;
- d) A posse e o manuseamento do organismo prejudicial, em violação do disposto no artigo 10.º

2 — A tentativa e a negligência são puníveis.

#### Artigo 13.º

##### Sanções acessórias

1 — Em função da gravidade da infracção e da culpa do agente, podem ser aplicadas, simultaneamente com as coimas, as seguintes sanções acessórias:

- a) Perda de objectos pertencentes ao agente;
- b) Interdição do exercício de profissões ou actividades cujo exercício dependa de título público ou de autorização ou de homologação de autoridade pública;
- c) Privação do direito a subsídio ou benefício outorgado por entidades ou serviços públicos;

- d) Privação do direito de participar em feiras ou mercados;
- e) Encerramento de estabelecimento cujo funcionamento esteja sujeito a autorização de autoridade administrativa;
- f) Suspensão de autorizações.

2 —As sanções previstas no número anterior têm a duração máxima de um ano.

3 — No caso de uma conduta contra-ordenacional ter ocasionado um grave risco de propagação do organismo prejudicial, deve ser dada publicidade à decisão condenatória definitiva de aplicação da coima, mediante a afixação de editais na sede da DRA da área onde foi praticada a infracção.

#### Artigo 14.º

##### Processos de contra-ordenação

Sem prejuízo das competências atribuídas por lei às autoridades policiais e fiscalizadoras, o levantamento dos autos e a instrução dos processos de contra-ordenação são da competência da DRAP da região em cuja área foi praticada a contra-ordenação, competindo ao director-geral da Agricultura e Desenvolvimento Rural a aplicação das coimas e sanções acessórias.

#### Artigo 15.º

##### Produto das coimas

O produto das coimas reverte:

- a) Em 10% para a entidade que levantou o auto de contra-ordenação;
- b) Em 10% para a entidade que instruiu o processo;
- c) Em 20% para a entidade que aplicou a coima;
- d) Em 60% para o Estado.

## CAPÍTULO III

### Disposições finais

#### Artigo 16.º

##### Aplicação às Regiões Autónomas

1 — Sem prejuízo das competências atribuídas à DGADR na qualidade de autoridade fitossanitária nacional, as competências atribuídas pelo presente decreto-lei às DRAP são exercidas nas Regiões Autónomas dos Açores e da Madeira pelos organismos dos departamentos regionais competentes.

2 — As competências previstas no artigo 14.º são exercidas nas Regiões Autónomas dos Açores e da Madeira pelos organismos definidos pelos órgãos de governo próprio.

3 — As percentagens previstas no artigo 15.º provenientes das coimas aplicadas nas Regiões Autónomas dos Açores e da Madeira constituem receita própria de cada uma delas.

#### Artigo 17.º

##### Norma revogatória

É revogada a Portaria n.º 140/95, de 9 de Fevereiro.

#### Artigo 18.º

##### Remissão

Todas as referências feitas para a portaria que agora se revoga consideram-se feitas para o presente decreto-lei.

Visto e aprovado em Conselho de Ministros de

O Primeiro-Ministro

O Ministro de Estado e dos Negócios Estrangeiros

O Ministro de Estado e das Finanças

O Ministro da Justiça

O Ministro do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional

O Ministro da Economia e da Inovação

O Ministro da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas

## ANEXO I

Esquema de ensaio para diagnóstico, detecção e identificação da bactéria responsável pela podridão anelar da batateira, *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis *et al.* ssp. *sepedonicus* (Spieckermann e Kotthoff) Davis *et al.*, para efeitos do presente anexo designada por *C. m.* subsp. *sepedonicus*

### Âmbito do esquema de ensaio

O esquema de ensaio apresentado descreve os vários procedimentos envolvidos:

- i) No diagnóstico da podridão anelar em tubérculos e plantas de batateira;
- ii) Na detecção de *C. m.* subsp. *sepedonicus* em amostras de tubérculos e plantas de batateira;
- iii) Na identificação de *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

### Princípios gerais:

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

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

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

É primordial a preparação rigorosa dos controlos positivos.

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

Uma ocorrência suspeita, tal como referido no n.º 1 do artigo 5.º, implica um resultado positivo nos testes de diagnóstico ou de rastreio numa amostra, tal como especificado nos fluxogramas.

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

Por isso, tal como referido na alínea *b)* do n.º 1 do artigo 5.º, um teste IF positivo é definido por uma leitura IF positiva confirmada por um segundo teste de rastreio (PCR/FISH).

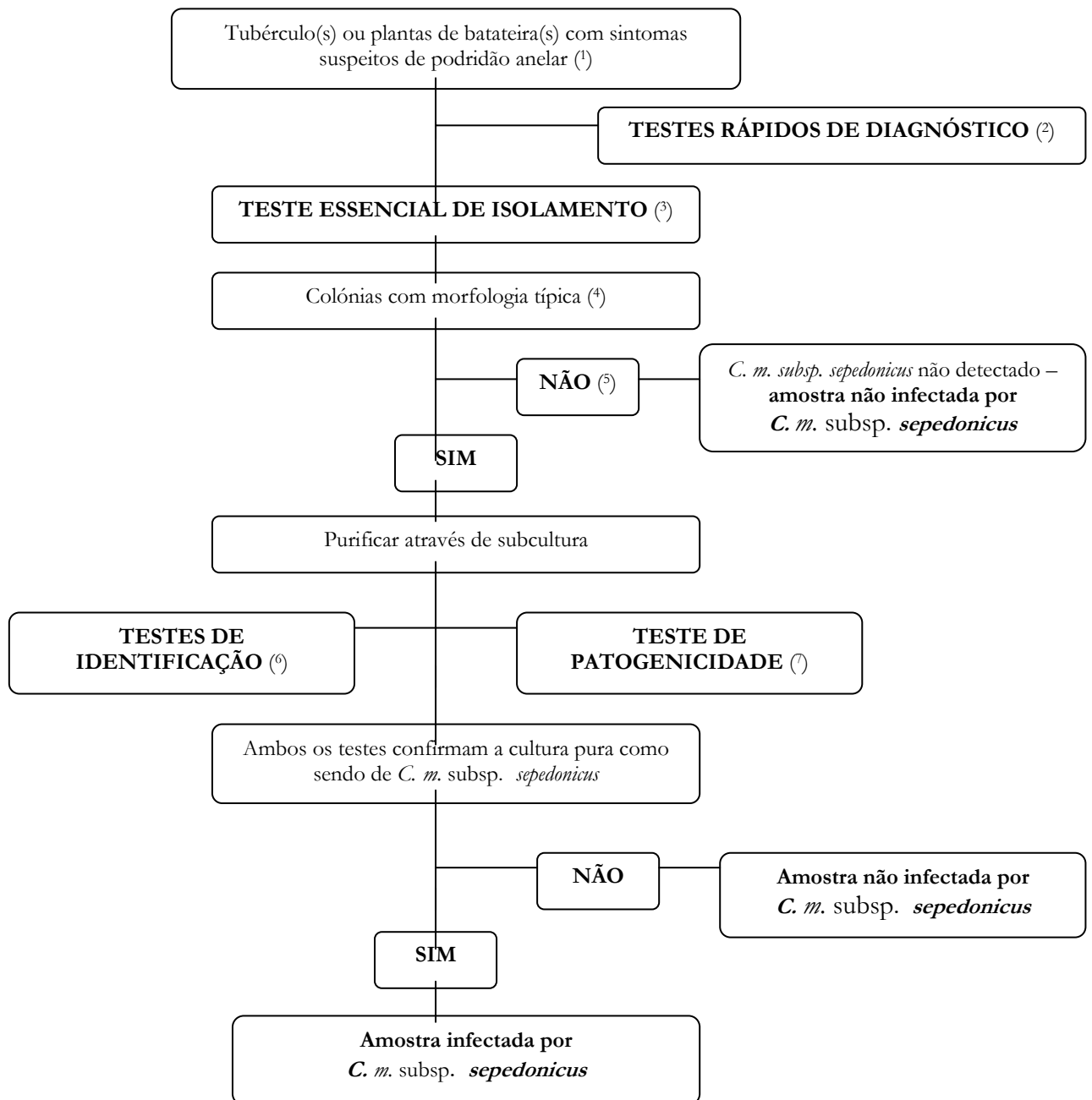
A presença confirmada, tal como referido no n.º 1 do artigo 6.º, implica o isolamento e identificação de uma cultura pura de *C. m.* subsp. *sepedonicus* com confirmação de patogenicidade.



1. — Apresentação do Fluxograma:

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

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



(1) A descrição dos sintomas é apresentada n.º 1.

(2) O testes adequados são:

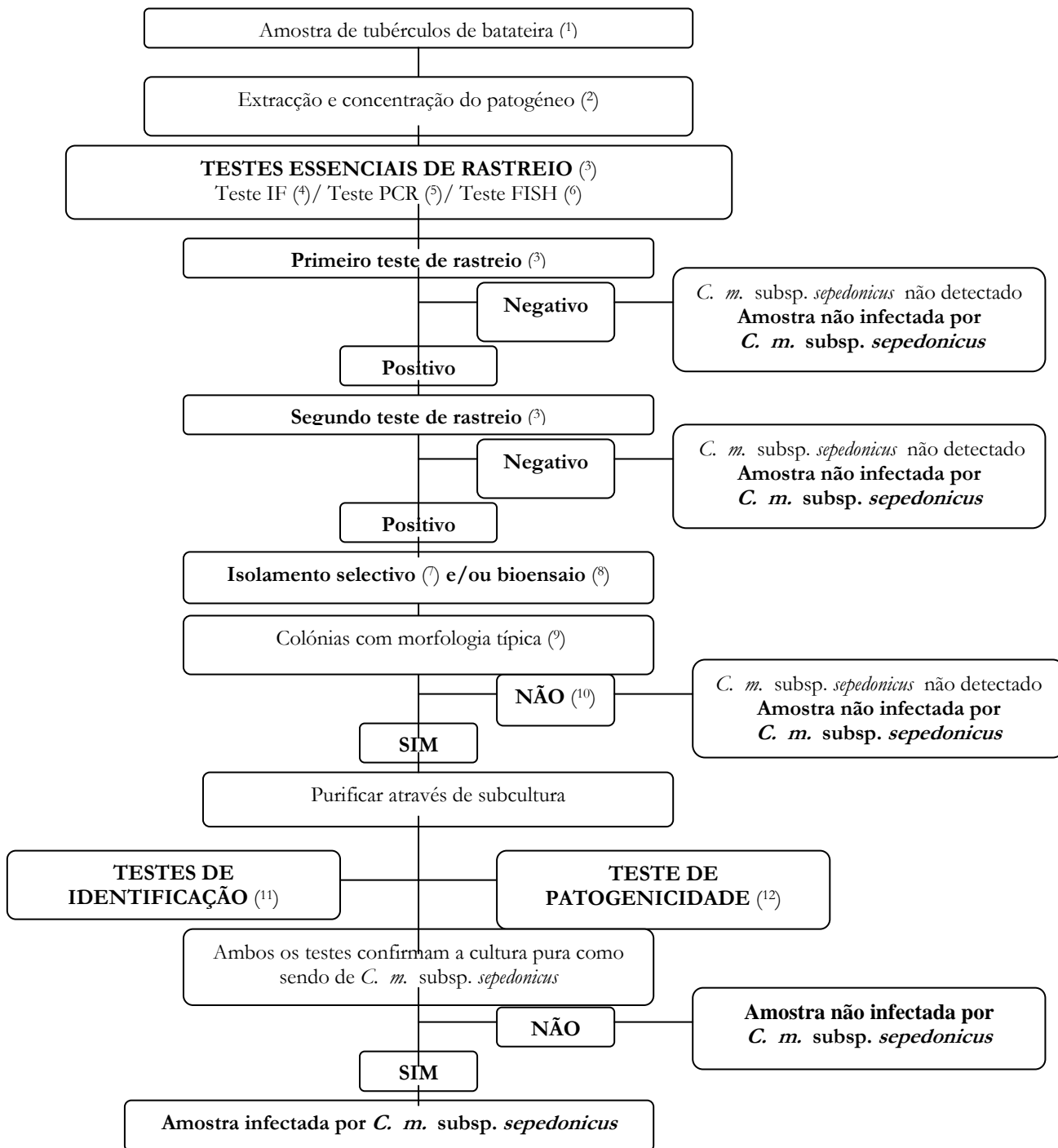
- Teste IF (n.º 4);
  - Teste PCR (n.º 6);
  - Teste FISH (n.º 5).
- (3) Embora o isolamento por diluição em placas do patógeno proveniente de material vegetal que apresente sintomas típicos seja simples, poderá não ser possível isolar a bactéria a partir de material vegetal em fase avançada de infecção devido à competição e/ou excessivo desenvolvimento de colónias de bactérias saprófitas. Por conseguinte, recomenda-se a utilização de meios de cultura não selectivos e selectivos, de preferência MTNA (n.º 8), bem como de um Bioensaio (n.º 7).
- (4) A descrição da morfologia típica da colónia é apresentada no n.º 8.
- (5) Se o teste de isolamento for negativo, apesar de os sintomas de doença serem típicos, deve repetir-se o isolamento.
- (6) Obtém-se uma identificação fiável de uma cultura pura de *C. m.* subsp. *sepedonicus*, através da realização dos testes referidos no n.º 9.
- (7) O teste de patogenicidade é descrito no n.º 10.

1.2. — Esquema para detecção e identificação de *C. m.* subsp. *sepedonicus* em amostras de tubérculos de batateira assintomáticos:

Princípio:

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

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



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

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

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

(4) Teste de imunofluorescência (IF).

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

(5) Teste PCR.

Utilizar os reagentes e protocolos PCR adequadamente validados (ver n.º 6).

(6) Teste FISH.

Utilizar reagentes e protocolos validados (ver n.º 5).

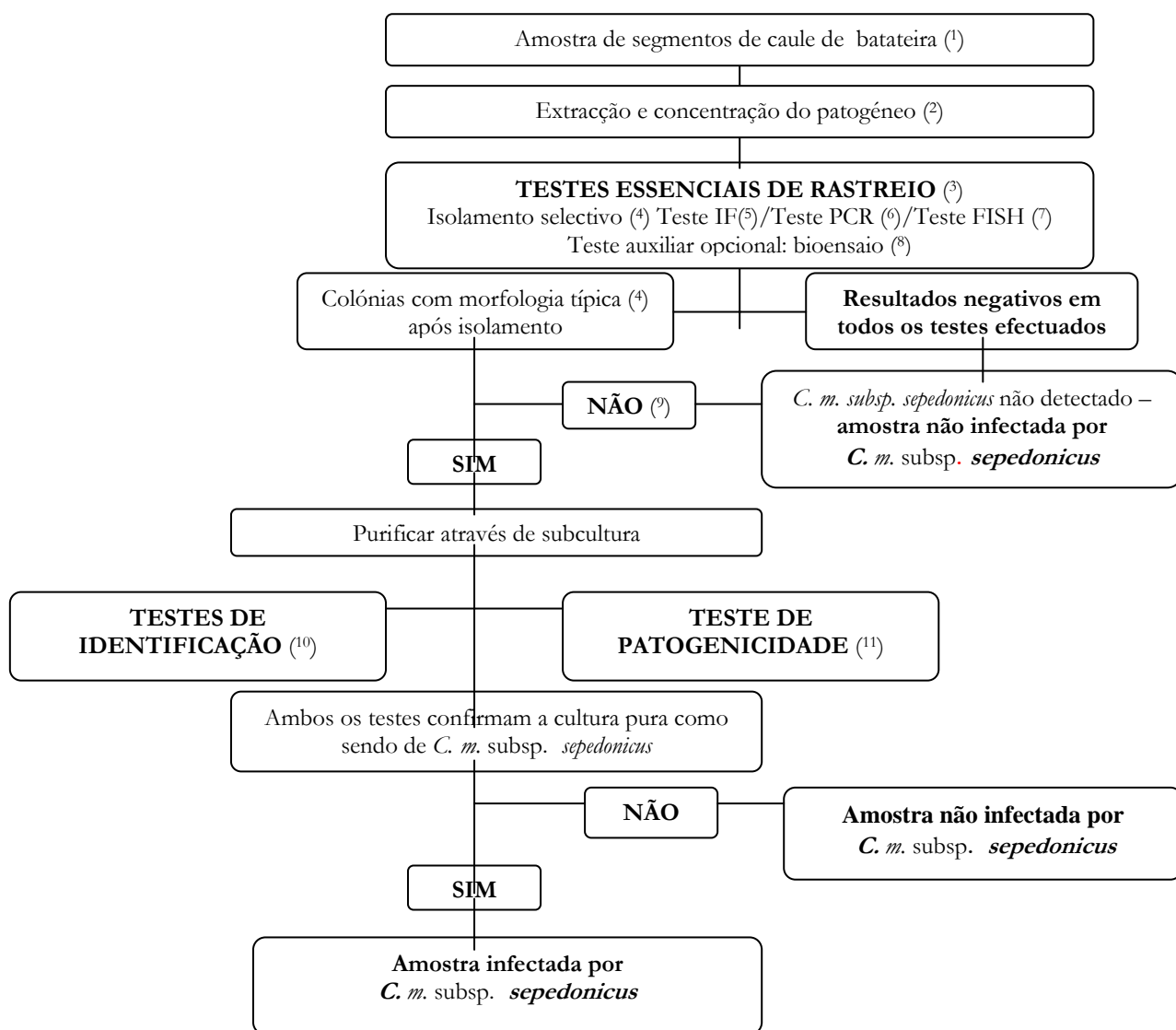
(7) Isolamento selectivo.

A utilização dos meios MTNA ou NCP-88 e uma diluição de 1/100 do sedimento ressuspenso constitui, em muitos casos, um método adequado para o isolamento directo de *C. m.* subsp. *sepedonicus*. Podem obter-se colónias típicas 3 a 10 dias após diluição em placas. Nessa altura, o patogéneo pode ser purificado e identificado. Para tirar o máximo partido das suas capacidades, o teste requer uma preparação cuidada dos cones dos hilos, de forma a evitar a proliferação de bactérias saprófitas associadas aos tubérculos da batateira, bactérias essas que são concorrentes com *C. m.* subsp. *sepedonicus* nos meios e que podem desenvolver-se em maior número do que o

patogéneo. Caso o teste de diluição em placas não seja bem sucedido, deve efectuar-se o isolamento a partir das plantas utilizadas no bioensaio (ver n.º 6).

- (8) O bioensaio é utilizado para o isolamento de *C. m.* subsp. *sepedonicus* a partir de sedimentos de extractos de batateira, através de um enriquecimento selectivo em beringelas (*Solanum melongena*). O teste requer condições óptimas de incubação, especificadas neste método. Não é provável que bactérias inibidoras de *C. m.* subsp. *sepedonicus* nos meios MTNA ou NCP-88 interfiram nos resultados deste teste (ver n.º 7).
- (9) A morfologia típica das colónias é descrita no n.º 8.
- (10) O isolamento ou os bioensaios podem conduzir à obtenção de falsos resultados negativos devido à competição ou inibição por bactérias saprófitas. Caso se obtenham resultados positivos claros nos testes de rastreio, mas os testes de isolamento sejam negativos, devem repetir-se os testes de isolamento a partir do mesmo sedimento ou através da colheita de tecido vascular adicional da zona do hilo de tubérculos já cortados da mesma amostra e, se necessário, analisar amostras adicionais.
- (11) Consegue-se a identificação fiável de presumíveis culturas puras de *C. m.* subsp. *sepedonicus*, através da utilização dos testes referidos no n.º 9.
- (12) O teste de patogenicidade é apresentado no n.º 10.

1.3. — Esquema para detecção e identificação de *C. m. subsp. sepedonicus* em amostras de plantas de batateira assintomáticas:





- (1) Ver n.º 3.2 para a dimensão recomendada das amostras.
- (2) Os métodos de extracção e concentração do patogéneo são descritos no n.º 3.2.
- (3) Caso, pelo menos, dois testes baseados em princípios biológicos diferentes sejam positivos, tem de se efectuar o isolamento do patogéneo e a confirmação da sua identificação.
- Efectuar, pelo menos, um teste de rastreio. Sempre que este teste for negativo, a amostra é considerada negativa. Caso este teste se revele positivo, são necessários um segundo ou mais testes de rastreio baseados em princípios biológicos diferentes, no sentido de verificar o primeiro resultado positivo. Caso o segundo teste, e qualquer outro dos testes efectuados sejam negativos, a amostra é considerada negativa. Não são necessários outros testes.
- (4) O teste de isolamento selectivo e a morfologia típica das colónias são descritos no n.º 8.
- (5) O teste IF é descrito no n.º 4.
- (6) O teste PCR descrito no n.º 6.
- (7) O teste FISH é descrito no n.º 5.
- (8) O bioensaio é descrito no n.º 7.
- (9) O isolamento ou os bioensaios podem conduzir à obtenção de falsos resultados negativos devido à competição ou inibição por bactérias saprófitas. Caso se obtenham resultados positivos nos testes de rastreio, mas os testes de isolamento sejam negativos, devem repetir-se os testes de isolamento e, se necessário, analisar amostras adicionais.
- (10) Consegue-se a identificação fiável de presumíveis culturas puras de *C. m.* subsp. *sepedonicus*, através da utilização dos testes referidos no n.º 9.
- (11) O teste de patogenicidade é apresentado no n.º 10.

## 2 — Observação visual dos sintomas de podridão anelar:

### 2.1 — Plantas de batateira:

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

### 2.2 — Tubérculos de batateira:

Os primeiros sintomas observam-se nos tecidos que envolvem o anel vascular, particularmente nas imediações da zona do hilo, que se apresentam ligeiramente vidrados ou translúcidos, sem podridões. O anel vascular à volta do hilo pode ter uma cor ligeiramente mais escura do que o normal. O primeiro sintoma facilmente identificável é a coloração amarelada do anel vascular e, quando se pressiona suavemente o tubérculo, emerge dos vasos um exsudado sob a forma de fitas. Esta

exsudação contém milhões de bactérias. O tecido vascular pode tornar-se acastanhado e os sintomas no tubérculo, nesta fase, são semelhantes aos do pus ou mal murcho provocado por *Ralstonia solanacearum*. No início, estes sintomas podem limitar-se a uma parte do anel, não necessariamente perto do hilo, e, em seguida, podem progredir gradualmente, atingindo todo o anel. À medida que a infecção progride, dá-se a destruição do tecido vascular e o córtex externo pode separar-se do córtex interno. Nos estádios mais avançados da infecção, surgem fissuras na superfície do tubérculo, frequentemente castanhas/avermelhadas nas margens. Registaram-se recentemente na Europa vários casos em que o córtex central apodrece ao mesmo tempo que o anel vascular, o que resulta numa invasão secundária com perfurações internas e necroses. Os sintomas podem ser camuflados por invasões por fungos ou bactérias secundárias, e pode ser difícil, ou mesmo impossível, distinguir os sintomas da podridão anelar numa fase avançada de qualquer outra podridão dos tubérculos. Existe a possibilidade de se verificarem sintomas atípicos. Podem encontrar-se imagens a cores de um conjunto de sintomas no [sítio \*web\*](http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main) <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

### 3 — Preparação da amostra:

#### 3.1 — Tubérculos de batateira:

##### *Nota:*

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

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

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

Pré-tratamento opcional antes da preparação da amostra:

Lavar os tubérculos. Utilizar os desinfetantes (compostos de cloro sempre que se utilizar o teste PCR, para destruir ADN de organismos saprófitas) e detergentes adequados entre cada amostra. Secar os tubérculos ao ar. Este procedimento de lavagem é útil (mas não obrigatório), em especial para amostras que apresentam um excesso de terra e quando se pretender utilizar um teste PCR ou um isolamento directo.

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

*Nota:*

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

Caso se observem sintomas suspeitos de podridão anelar durante a remoção do cone da zona do hilo, o tubérculo em questão deve ser visualmente inspeccionado após o corte próximo do hilo. Qualquer tubérculo cortado exibindo sintomas suspeitos deverá ser suberizado durante 2 dias à temperatura ambiente e armazenado em quarentena (entre 4° a 10°C) até todos os testes terem sido concluídos. Todos os tubérculos da amostra (incluindo os que apresentam sintomas suspeitos) devem ser conservados de acordo com o disposto no anexo II.

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

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

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

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

*Nota:*

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

contaminação por ADN dos recipientes ou instrumento de trituração. Sempre que se utilize o teste PCR, recomenda-se a trituração em sacos descartáveis e a utilização de tubos descartáveis.

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

3.1.5 — Concentrar a fracção bacteriana por centrifugação a 7000g durante 15 minutos (ou 10000 g durante 10 minutos) a uma temperatura compreendida entre 4 e 10°C e desprezar o sobrenadante sem perturbar o sedimento.

3.1.6 — Ressuspender o sedimento em 1,5 ml de tampão de ressuspensão (apêndice n.º 3). Utilizar 500µl para o teste de detecção de *C. m. subsp. sepedonicus*, 500µl para o teste de detecção de *Ralstonia solanacearum* e 500µl para fins de referência. Adicionar glicerol esterilizado até obter uma concentração final de 10-25% (v/v) aos 500µl das alíquotas de referência e à alíquota remanescente da amostra em estudo; agitar em vórtice e armazenar entre -16 e -24°C (semanas) ou entre -68 e -86°C (meses). Manter a alíquota remanescente da amostra em estudo a uma temperatura entre 4 e 10°C durante o período de ensaio.

Não se aconselha a congelação e descongelação repetidas.

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

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

### 3.2 — Plantas de batateira:

*Nota:*

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

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

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

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

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

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

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

3.2.3 — Decantar o sobrenadante após 15 minutos de repouso.

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

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

4 — Teste IF:

Princípio:

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

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

*Nota:*

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



Utilizar anticorpos contra uma estirpe de referência de *C. m.* subsp. *sepedonicus*. Recomenda-se a determinação do título para cada novo lote de anticorpos. O título é definido como a diluição mais elevada para a qual se verifica uma reacção óptima ao testar uma suspensão contendo  $10^5$  a  $10^6$  células por ml da estirpe homóloga de *C. m.* subsp. *sepedonicus*, e recorrendo a um conjugado de isotiocianato de fluoresceína (FITC), de acordo com as recomendações do fabricante. Os anticorpos policlonais ou monoclonais nativos devem possuir um título IF de, pelo menos, 1:2000. Durante o teste, os anticorpos devem ser utilizados em diluições de trabalho (DT) próximas do título ou no seu valor exacto. Utilizar anticorpos validados (ver sítio web <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

O teste deve ser realizado com extractos de amostras recentemente preparados. Se necessário, pode ser executado com sucesso em extractos armazenados entre  $-68$  e  $-86^{\circ}\text{C}$  e conservados em glicerol. O glicerol pode ser retirado da amostra através da adição de 1 ml de tampão de ressuspensão (apêndice n.º 4), nova centrifugação durante 15 minutos a 7000g e ressuspensão num volume igual de tampão de ressuspensão. Este procedimento é frequentemente desnecessário, em especial se as lâminas forem fixadas à chama (ver n.º 2.2).

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

Sempre que possível, deve também ser utilizado material vegetal naturalmente infectado (liofilizado ou congelado a uma temperatura compreendida entre  $-16$  e  $-24^{\circ}\text{C}$ ) como controlo positivo na mesma lâmina.

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

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

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

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

i) Para sedimentos com relativamente pouco amido:

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

ii) Para outros sedimentos:

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

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

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

4.3 — Procedimento IF:

i) De acordo com a preparação da lâmina descrita na alínea i) do n.º 4.1:

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

ii) De acordo com a preparação da lâmina descrita na alínea ii) do n.º 4.1:

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

FIGURA N.º 1

Preparação da lâmina de acordo com a alínea i) do n.º 4.1 e a alínea i) do n.º 4.3

Diluições do sedimento ressuspenso

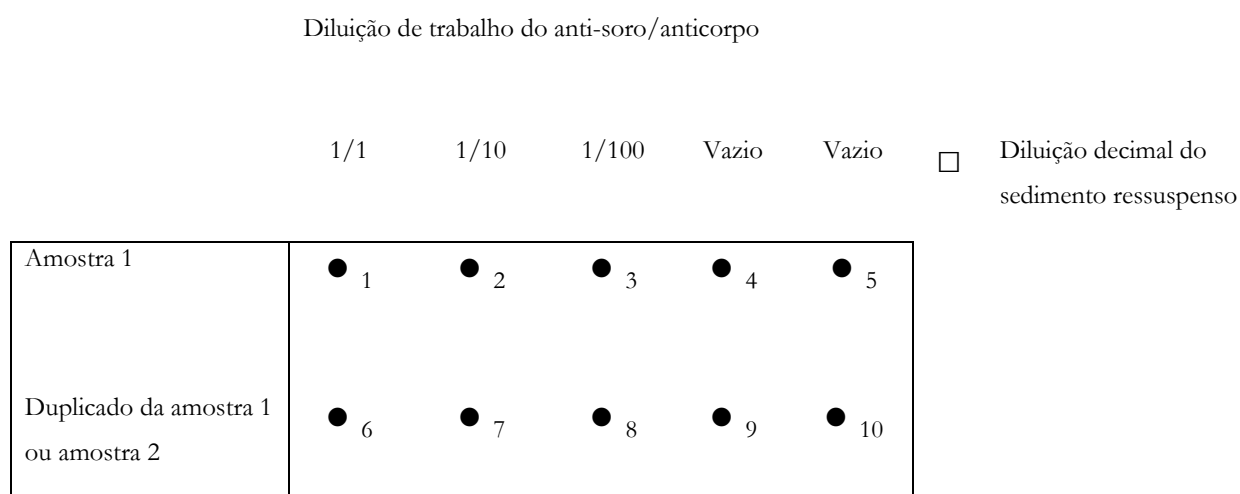
1/100      1/1      1/1      1/1      1/1       Diluição do sedimento ressuspenso

T = Título)      T/2      T/4      T/2      T      2T       Diluições 1/2 do anti-soro/anticorpo

Amostra 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5
Duplicado da amostra 1 ou amostra 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10

FIGURA N.º 2

Preparação da lâmina de acordo com a alínea *ii)* do n.º 4.1 e a alínea *ii)* do n.º 4.3



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

O procedimento seguinte deve ser efectuado na ausência de instruções específicas dos fornecedores dos anticorpos.

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

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

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

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

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

Retirar cuidadosamente o excesso de humidade.

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

4.4 — Leitura do teste IF:

4.4.1 — Examinar as lâminas do teste num microscópio de epifluorescência, com filtros adequados para excitação do FITC, utilizando uma lente de imersão em óleo ou água, com uma ampliação de 500-1000x. Examinar os poços ao longo de dois diâmetros perpendiculares e à volta do perímetro. Para amostras que não revelem células, ou cujo número seja reduzido, observar, pelo menos, 40 campos do microscópio.

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

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

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

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

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

4.4.5 — Interpretação do teste IF:

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

*Nota:*

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

ii) A leitura do teste IF revela um resultado negativo para amostras com menos de  $5 \times 10^3$  células por ml de sedimento ressuspenso, sendo a amostra considerada negativa.

*Nota:*

A realização de outros testes não é obrigatória.

#### 5 — Teste FISH:

Princípio:

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

*Nota:*

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

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

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

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

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

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

5.1 — Fixação do extracto de batata:

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

5.1.1 — Preparar a solução fixadora (ver apêndice n.º 7).

5.1.2 — Pipetar 100 µl de cada extracto de amostra para um tubo Eppendorf e centrifugar durante 8 minutos a 7000g.

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

Etanol a 96% constitui um fixador alternativo. Para o utilizar, dissolver o sedimento referido no n.º 5.1.2, em 50µl de tampão fosfato 0,01M e 50µl de etanol a 96%. Agitar em vortex e incubar a 4°C durante 30 a 60 minutos.

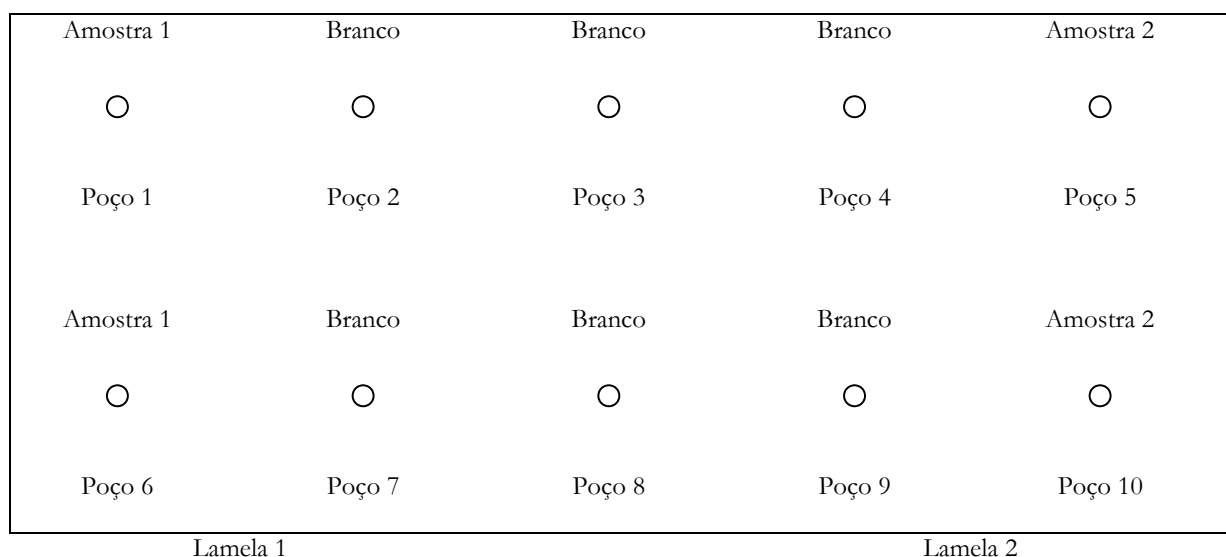


5.1.4 — Centrifugar durante 8 minutos a 7000g, remover o sobrenadante e ressuspender o sedimento em 75µl de tampão fosfato 0,01M (ver apêndice n.º 3).

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

FIGURA N.º 3

Configuração para a lâmina FISH



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

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

## 5.2 — Pré-hibridação e hibridação:

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

Alternativamente, em vez de lisozima, adicionar 50 µl de uma solução de proteinase K 40-400µgml<sup>-1</sup> em tampão (Tris HCl 20mM, CaCl<sub>2</sub> 2mM, pH 7,4) a cada poço e incubar a 37°C durante 30 minutos.

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

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

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

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

5.2.6 — Aplicar duas lamelas (24 x 24 mm) em cada lâmina, sem retenção de ar. Colocar as lâminas na câmara húmida pré-aquecida e hibridar de um dia para o outro na estufa a 55°C, no escuro.

5.2.7 — Preparar 3 copos contendo 1 l de água ultra pura (UPW), 1 l de 1x «hybmix» (334 ml de 3 x «hybmix» e 666 ml de UPW) e 1 l de ½ x «hybmix» (167 ml de 3x «hybmix» e 833 ml de UPW). Pré-incubar cada um deles em banho-maria a 55°C.

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

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

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

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

5.3 — Leitura do teste FISH:

5.3.1 — Observar imediatamente as lâminas com um microscópio equipado para microscopia de epifluorescência, sob lente de imersão em óleo, a uma ampliação de 630 ou 1000x. Com um filtro indicado para isotiocianato de fluoresceína (FITC), as células eubacterianas (incluindo a maior parte das células gram-negativas) presentes na amostra mostram uma coloração verde fluorescente. Com um filtro para isotiocianato-5-tetrametilrodamina, as células de *C. m. subsp. sepedonicus* coradas com Cy3 revelam-se vermelho fluorescente. Comparar a morfologia das células com a dos controlos positivos. As células devem apresentar-se com uma fluorescência brilhante e completamente coradas. O teste FISH (n.º 9.4) deve ser repetido se a coloração for aberrante. Examinar os poços ao longo de dois diâmetros perpendiculares e à volta do perímetro. Para amostras que não revelem células, ou cujo número seja reduzido, observar, pelo menos, 40 campos do microscópio.

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

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

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

5.3.5 — Considerar unicamente as células fluorescentes de dimensões e morfologia típicas, ver n.º 5.3.2.

5.3.6 — Interpretação do resultado do teste FISH:

z) Obtêm-se resultados válidos para o teste FISH quando se observarem, com um filtro para FITC, células brilhantes com fluorescência verde de dimensões e morfologia típicas de *C. m.* subsp. *sepedonicus* e, com o filtro para rodamina, células brilhantes com fluorescência vermelha em todos os controlos positivos, as quais deverão estar ausentes em todos os controlos negativos. Se forem detectadas células fluorescentes brilhantes e com a morfologia característica, determinar o número médio de células típicas por cada campo do microscópio e calcular o número de células típicas por ml de sedimento ressuspenso (apêndice n.º 4). As amostras com, pelo menos,  $5 \times 10^3$  células típicas por ml de

sedimento ressuspensão são consideradas como potencialmente contaminadas. A realização de outros testes é obrigatória. As amostras com menos de  $5 \times 10^3$  células típicas por ml de sedimento ressuspensão são consideradas negativas;

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

#### 6 — PCR:

##### Princípios:

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

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

##### Nota:

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

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

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

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

Devem ser incluídos no teste PCR os seguintes controlos negativos:

- Extracto de amostra que tenha anteriormente sido testado e se tenha revelado negativo relativamente à presença de *C. m. subsp. sepedonicus*;
- Controlos dos tampões utilizados para extrair a bactéria e o ADN da amostra;
- Mistura de reacção da PCR.

Devem ser incluídos os seguintes controlos positivos:

- Alíquotas de sedimentos ressuspensos às quais se adicionou *C. m. subsp. sepedonicus* (ver preparação no apêndice n.º 2);
- Uma suspensão em água contendo  $10^6$  células por ml de um isolado virulento (por exemplo, NCPPB 2140 ou NCPPB 4053) de *C. m. subsp. sepedonicus*;
- Se possível, utilizar também ADN extraído de amostras de controlo positivas no teste PCR.

*Nota:*

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

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

#### 6.1 — Métodos de purificação do ADN:

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

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

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

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

#### 6.1 — a) Método segundo Pastrick (2000):

- 1) Pipetar 220µl de tampão de lise (NaCl 100mM, Tris-HCl 10mM [pH 8,0], EDTA 1 mM [pH 8,0]) para um tubo Eppendorf de 1,5ml;
- 2) Adicionar 100µl de extracto de amostra e colocar num bloco de aquecimento ou em banho-maria a 95°C durante 10 minutos;
- 3) Colocar o tubo em gelo durante 5 minutos,
- 4) Adicionar 80µl de solução concentrada de lisozima (50mg de lisozima por ml em Tris HCl 10mM, pH 8,0) e incubar a 37°C durante 30 minutos;
- 5) Adicionar 220 µl de solução A Easy DNA<sup>®</sup> (Invitrogen), misturar bem em vórtice e incubar a 65°C durante 30 minutos;
- 6) Adicionar 100µl de solução B Easy DNA<sup>®</sup> (Invitrogen), agitar vigorosamente em vortex até que o precipitado se desloque livremente no tubo e a amostra esteja uniformemente viscosa;

- 7) Adicionar 500µl de clorofórmio e agitar em vortex até que a viscosidade diminua e a mistura se torne homogénea;
- 8) Centrifugar a 15000g durante 20 minutos a 4°C para separar as fases e formar a interfase;
- 9) Transferir a fase superior para um tubo Eppendorf limpo,
- 10) Adicionar 1ml de etanol a 100% (-20°C) agitar brevemente em vortex e incubar no gelo durante 10 minutos,
- 11) Centrifugar a 15000g durante 20 minutos a 4°C e remover o etanol do sedimento;
- 12) Adicionar 500µl de etanol a 80% (-20°C) e misturar invertendo o tubo;
- 13) Centrifugar a 15000g durante 10 minutos a 4°C, guardar o sedimento e remover o etanol;
- 14) Deixar secar o sedimento ao ar ou em «DNA *speed vac*»;
- 15) Ressuspender o sedimento em 100µl de UPW esterilizada e deixar à temperatura ambiente durante, pelo menos, 20 minutos;
- 16) Armazenar a -20°C até ser necessário para a realização da PCR;
- 17) Centrifugar qualquer precipitado branco até que este se deposite no fundo e utilizar 5µl do sobrenadante contendo ADN para a PCR.

6.1 — *b*) Outros métodos:

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



## 6.2 — PCR:

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

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

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

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

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

## 6.3 — Análise do produto da PCR:

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

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

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

6.3.4 — Para todas as novas detecções/situações, verificar a autenticidade do fragmento amplificado pela PCR através da realização de análise de restrição enzimática na amostra do ADN amplificado restante, por incubação com uma enzima de restrição e um tampão adequados à temperatura e com duração óptimas (apêndice n.º 6). Proceder em seguida, tal como anteriormente, à electroforese em gel de agarose dos fragmentos digeridos e observar o padrão dos fragmentos de restrição característico num transiluminador com UV, após coloração com brometo de etídio, e comparar com o controlo positivo não digerido e digerido.

Interpretação do resultado do teste PCR:

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

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

*Nota:*

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

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

7 — Bioensaio:

*Nota:*

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

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

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

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

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

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

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

7.3 — Inoculação por fenda:

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

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

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

7.4 — Inoculação por injeção:

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

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

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

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

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

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

7.9 — Logo que se observem sintomas nas beringelas, deverá efectuar-se o re-isolamento, utilizando-se secções de tecido foliar exibindo murchidão ou do caule das plantas (ver n.º 3.2.2, para a maceração do tecido). Desinfectar a superfície das folhas e caules das beringelas passando-os por etanol a 70%. Efectuar um teste IF ou PCR da seiva da beringela e isolar em meios (selectivos) adequados (ver n.º 8). Pode também ser realizada uma coloração de Gram (apêndice n.º 9). Identificar culturas puras de presumíveis isolados de *C. m.* subsp. *sepedonicus* e confirmar a sua patogenicidade (ver n.ºs 9 e 10).

7.10 — Em certas circunstâncias, especialmente quando as condições de cultivo não são as óptimas, é possível que *C. m.* subsp. *sepedonicus* esteja presente nas beringelas embora sob a forma de infecção latente, mesmo depois de períodos de incubação de até 4 semanas. Caso não se observem sintomas após 4 semanas, efectuar o teste IF ou PCR numa amostra composta de secções do caule com 1 cm de cada uma das plantas inoculadas, colhidas acima do local da inoculação. Se os resultados do teste forem positivos, deverá efectuar-se o re-isolamento em meios adequados (selectivos), de acordo com o procedimento referido no n.º 8. Identificar culturas

puras de presumíveis isolados de *C. m. subsp. sepedonicus* e confirmar a sua patogenicidade (n.º 9 e 10).

Interpretação do resultado do bioensaio:

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

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

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

8 — Isolamento de *C. m. subsp. sepedonicus*:

*Nota:*

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

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

Devem ser efectuados isolamentos de todos os tubérculos ou segmentos de caule de batateira que apresentem sintomas típicos, bem como de beringelas inoculadas que, muito embora possam não ter manifestado sintomas, se revelem positivas no teste IF/PCR realizado sobre amostras compostas (ver n.º 7.10). A maceração dos caules de beringela, quando necessária, deve ser efectuada tal como descrito no n.º 3.2.2.

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

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

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

#### 8.1 — Diluição em placas com meio selectivo:

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

8.1.2 — O isolamento a partir de sedimento ressuspensão de batateira não diluído é frequentemente infrutífero em consequência da lentidão do crescimento de *C. m.* subsp. *sepedonicus* e da competição de organismos saprófitas. Contudo, visto que as populações da bactéria presentes nos tecidos infectados são habitualmente elevadas, os organismos saprófitas podem geralmente ser eliminados por diluição, enquanto que o patogéneo permanece. Assim, recomenda-se o espalhamento de 100µl de cada uma das amostras em estudo, diluições 1/100 a 1/10000, nos meios MTNA ou NCP-88 (apêndice n.º 5) (caso se utilizem placas de Petri de 90mm de diâmetro; para outros diâmetros de placa, ajustar o volume), com recurso a varetas em l e à técnica de diluição em placa.



*Nota:*

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

8.1.3 — Incubar as placas, no escuro, a uma temperatura compreendida entre 21 e 23°C.

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

8.2 — Purificação de colónias suspeitas:

*Nota:*

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

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

- Agar nutritivo com dextrose (só para utilização em subcultura);
- Agar com peptona, levedura e glucose;
- Agar com extracto de levedura e sais minerais.

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

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

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

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

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

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

9 — Identificação:

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

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

### 9.1.— Testes nutricionais e enzimáticos de identificação:

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

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

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

Testes	Resultado esperado
Teste de oxidação/fermentação (O/F)	Inerte ou fracamente oxidativa
Produção de oxidase	—
Crescimento a 37°C	—
Produção de urease	—
Hidrólise da esculina	+
Hidrólise do amido	— ou fraca
Tolerância a NaCl a 7%	—
Produção de indole	—
Produção de catalase	+
Produção de H <sub>2</sub> S	—
Utilização de citrato	—
Liquefacção da gelatina	—
Produção de ácido a partir de glicerol	—
Produção de ácido a partir de lactose	— ou fraca
Produção de ácido a partir de ramnose	—
Produção de ácido a partir de salicina	—
Coloração de Gram (apêndice n.º 9)	+

### 9.2 —Teste IF:

- a) Preparar uma suspensão com cerca de 10<sup>6</sup> células por ml em tampão IF (apêndice n.º 3);
- b) Preparar uma série de diluições a 1/2 de um anti-soro adequado;
- c) Aplicar o procedimento de IF (n.º 4);
- d) Um resultado positivo no teste IF é alcançado se o título IF da cultura for equivalente ao do controlo positivo.

### 9.3 — Teste PCR:

- a) Preparar uma suspensão com cerca de  $10^6$  células por ml em água ultra pura (UPW);
- b) Aquecer 100µl da suspensão de células em tubos fechados num bloco de aquecimento ou em banho-maria a 100°C durante 4 minutos. Se necessário, a adição de hidróxido de sódio recentemente preparado com uma concentração final de 0,05M pode auxiliar a lise das células. As amostras podem, então, ser armazenadas a uma temperatura compreendida entre -16 e -24°C até serem necessárias;
- c) Aplicar os procedimentos da PCR adequados para assim se obterem os fragmentos amplificados específicos de *C. m. subsp. sepedonicus* (por exemplo, Pastrick, 2000, ver apêndice n.º 6 ou ainda Li e de Boer, 1995; Mills *et al.*, 1997; Pastrick e Rainey, 1999; Schaad *et al.*, 1999);
- d) É alcançada uma identificação positiva de *C. m. subsp. sepedonicus* se os fragmentos amplificados pela PCR tiverem o mesmo tamanho e padrão de restrição que a estirpe de controlo positivo.

### 9.4 — Teste FISH:

- a) Preparar uma suspensão com cerca de  $10^6$  células por ml em UPW;
- b) Aplicar o procedimento FISH (n.º 5);
- c) Um resultado positivo no teste FISH é alcançado se isolado em estudo apresentar as mesmas reacções do controlo positivo.

### 9.5 — Perfis de ácidos gordos (FAP):

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

- b) Utilizar um procedimento FAP adequado (Janse, 1991; Stead, 1992);
- c) Um resultado positivo no teste FAP é alcançado se o perfil do isolado em estudo for idêntico ao do controlo positivo. A presença de ácidos gordos característicos 15:1 Anteiso A, 15:0 Iso, 15:0 Anteiso, 16:0 Iso, 16:0 e 17:0 Anteiso é altamente indicativa de *C. m. subsp. sepedonicus*. Outros géneros como *Curtobacterium*, *Arthrobacter* e *Micrococcus* também têm alguns destes ácidos mas o 15:1 Anteiso A é um ácido raro nestas bactérias que ocorre, no entanto, em *Clavibacter* spp. com um valor entre 1 e 5 %. Para *C. m. subsp. sepedonicus* o valor é, normalmente, de cerca de 5%.

#### 9.6 — BOX-PCR:

- a) Preparar uma suspensão com cerca de  $10^6$  células por ml em UPW;
- b) Aplicar o teste de acordo com o procedimento descrito por Smith *et al.*, (2001).

#### 10 — Teste de confirmação:

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

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

10.2 — Inocular 5-10 caules de beringelas provenientes de plântulas no estado fenológico de 3 folhas verdadeiras (n.º 7.3 ou 7.4).

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

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

## APÊNDICE N.º 1

### Laboratórios envolvidos na optimização e na validação de protocolos

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

<sup>(1)</sup> Cientistas de contacto: ver sítio web <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

## APÊNDICE N.º 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

### APÊNDICE N.º 3

#### Tampões para a realização dos testes

*Geral:*

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

1 — Tampões para extracção:

1.1 — Tampão de extracção (tampão fosfato 50mM, pH 7,0):

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

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anidro)	4,26g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,72g
Água destilada	1,00 l

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

Os seguintes componentes adicionais podem também ser úteis:

	Finalidade	Quantidade (por l)
Flocos de Lubrol	Antifloculante (*)	0,5g
Antiespuma DC silicone	Antiespumante (*)	1,0ml
Pirofosfato tetrassódico	Antioxidante	1,0g
Polivinilpirrolidona-40000 (PVP-40)	Complexante de inibidores da PCR	50g

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

#### 1.2 — Tampão de ressuspensão (tampão fosfato 10mM, pH 7,2):

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

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2,7g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,4g
Água destilada	1,00 l

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

#### 2 — Tampões para o teste IF:

##### 2.1 — Tampão IF (tampão fosfato salino (PBS) 10mM, pH 7,2):

Este tampão é utilizado para a diluição dos anticorpos e segundo passo da lavagem das lâminas.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2,7g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,4g
NaCl	8,0g
Água destilada	1,0 l

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

#### 2.2 — Tampão IF-*Tween*:

Este tampão é utilizado no primeiro passo da lavagem das lâminas.

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

#### 2.3 — Tampão fosfato com glicerol, pH 7,6:

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

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	3,2g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,15g
Glicerol	50ml
Água destilada	100 ml

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

## APÊNDICE N.º 4

### Determinação do nível de contaminação nos testes IF e FISH

1 — Determinar o número médio de células fluorescentes típicas por campo de observação (c).

2 — Calcular o número de células fluorescentes típicas por poço de lâmina de microscópio (C):

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

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

s = área da superfície do campo da objectiva

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

Em que: i = coeficiente de campo (varia entre 8 e 24, dependendo do tipo de ocular)

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

G = ampliação da objectiva (100x, 40x, etc.)

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

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

F

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

F = factor de diluição do sedimento ressuspenso

## APÊNDICE N.º 5

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

a) Meios gerais de crescimento:

Agar nutritivo (NA)

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

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

Agar nutritivo com dextrose (NDA)

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

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

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

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

Extracto de levedura e sais minerais (YGM)

Bacto extracto de levedura (Difco)	2,0g
D(+)glucose mono-hidratada	2,5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,25g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,25g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,015g
NaCl	0,05g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,005g
Bacto-Agar (Difco)	18,0g
Água destilada	1,0 l

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

*b)* Meios de crescimento selectivo validados:

Meio MTNA

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

Extracto de levedura (Difco)	2,0g
Manitol	2,5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,25g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,25g
NaCl	0,05g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,015g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,005g
Agar (Oxoid n.º 1)	16,0g
Água destilada	1,0 l

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

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

*Nota:*

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

Meio NCP-88

Agar nutritivo (Difco)	23,0g
Extracto de levedura (Difco)	2,0g
D-manitol	5,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,25g

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

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

*Nota:*

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



## APÊNDICE N.º 6

### Protocolo e reagentes da PCR validados

*Nota:*

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

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

1 — Protocolo PCR Multiplex com controlo interno da PCR (Patrik, 2000):

1.1 — Iniciadores:

Iniciador directo PSA-1	5'- ctc ctt gtg ggg tgg gaa aa -3'
Iniciador inverso PSA-R	5'- tac tga gat gtt tca ctt ccc c -3'
Iniciador directo NS-7-F	5'- gag gca ata aca ggt ctg tga tgc -3'
Iniciador inverso NS-8-R	5'- tcc gca ggt tca cct acg ga -3'

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

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

## 1.2 — Mistura de reacção da PCR:

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

<sup>(1)</sup> Os métodos foram validados utilizando *Taq* polimerase da Perkin Elmer (AmpliTaq ou Gold) e Gibco BRL.

<sup>(2)</sup> A concentração de iniciadores NS-7-F e NS-8-R foi otimizada para a extracção da bactéria a partir dos cones dos hilos dos tubérculos de batateira, utilizando o método de homogeneização bem como o de purificação do ADN de acordo com Pastrok (2000) (ver alínea *a*) do n.º 6.1 e o n.º 6.2). Será necessária a re-otimização das concentrações do reagente se se utilizar a extracção por agitação ou outros métodos de isolamento do ADN.

## 1.3 — Condições de reacção da PCR:

Correr o seguinte programa:

1 ciclo de:	<i>i)</i>	3 minutos a uma temperatura de 95°C (desnaturação do ADN- alvo).
10 ciclos de:	<i>ii)</i>	1 minuto a uma temperatura de 95°C (desnaturação do ADN-alvo);
	<i>iii)</i>	1 minuto a uma temperatura de 64°C (emparelhamento dos iniciadores);
	<i>iv)</i>	1 minuto a uma temperatura de 72°C (extensão da cópia).
25 ciclos de:	<i>v)</i>	30 segundos a uma temperatura de 95°C (desnaturação do ADN-alvo);
	<i>vi)</i>	30 segundos a uma temperatura de 62°C (emparelhamento dos iniciadores);
	<i>vii)</i>	1 minuto a uma temperatura de 72°C (extensão da cópia);
1 ciclo de:	<i>viii)</i>	5 minutos a uma temperatura de 72°C (extensão final);
	<i>ix)</i>	Manter a uma temperatura de 4°C.

*Nota:*

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

1.4 — Análise de restrição enzimática do fragmento amplificado:

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

2 — Preparação do tampão de carregamento:

2.1 — Azul de bromofenol (solução concentrada a 10%):

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

2.2 — Tampão de carregamento:

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

3 — Tampão de tris acetato EDTA (TAE) 10X, pH 8,0:

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

Diluir até 1x antes de utilizar.

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

## APÊNDICE N.º 7

### Reagentes validados para o teste FISH

#### 1 — Sondas:

Sonda específica para *C. m.* subsp. *sepedonicus* CMS- 5'- ttg cgg ggc gca cat ctc tgc acg -3'  
CY3-01

Sonda para eubactérias não específica EUB-338-FITC 5'- gct gcc tcc cgt agg agt -3'

#### 2 — Solução fixadora:

##### *Nota:*

Atenção! O fixador contém paraformaldeído, um produto tóxico. Utilizar luvas e não inalar. É aconselhável trabalhar em «hotte».

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

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

##### *Nota:*

Atenção! Não utilizar um medidor de pH em soluções contendo paraformaldeído.

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

iv) *Nota:*

Solução fixadora alternativa: etanol a 96%.

3 — «Hybmix» 3X:

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

Diluir até 1x, conforme necessário.

4 — Solução de hibridação:

«Hybmix» 1X:

Dodecilsulfato de sódio (SDS)	0,01%
Sonda EUB 338	5 ng/ $\mu$ l
Sonda CMSCY301	5 ng/ $\mu$ l

Preparar quantidades de solução de hibridação, de acordo com os cálculos apresentados seguidamente. Para cada lâmina (contendo 2 amostras diferentes em duplicado) são necessários 90 $\mu$ l de solução de hibridação.

Quantidades sugeridas para a preparação da solução de hibridação

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

*Nota:*

Armazenar todas as soluções contendo sondas fotossensíveis, no escuro, a uma temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ . Proteger da exposição directa à luz solar ou eléctrica durante a utilização.

5 — Tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	8,52 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	5,44 g
Água destilada	1,00 l

Dissolver os ingredientes, verificar o pH e esterilizar em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.

## APÊNDICE N.º 8

### Condições de cultivo de beringela

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

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

Fotoperíodo		14 horas ou duração do dia natural se esta for superior;
Temperatura	diurna	21 a 24°C;
	nocturna	15°C.
Variedades de beringela susceptíveis:		«Black Beauty»;
		«Long Tom»;
		«Rima»;
		«Balsas».

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



## APÊNDICE N.º 9

Coloração de Gram (modificação de Hucker) (Doetsch, 1981) (\*)

Solução de violeta de cristal:

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

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

Misturar as duas soluções.

Solução de Lugol:

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

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

Solução de safranina para contraste:

Solução concentrada:

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

Misturar e guardar.

Diluir 1:10 para obter uma solução de trabalho.

Procedimento de coloração:

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

*Nota:*

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

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

## Referências bibliográficas

1. Anónimo, 1987. Scheme of the detection and diagnosis of the ring rot bacterium *Corynebacterium sepedonicum* in batches of potato tubers. Comissão das Comunidades Europeias, Luxemburgo. Publ EUR 11288 EN, 21 pp.
2. Bradbury, J. F., 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. Rev. Pl. Path., 49, 213-218.
3. Dinesen, I. G., 1984. The extraction and diagnosis of *Corynebacterium sepedonicum* from diseased potato tubers. EPPO Bol. 14 (2), 147-152.
4. Doetsch, R. N., 1981. Determinative methods of light microscopy. Em: Manual of methods for general bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, 21-23.
5. Hugh, R. e Leifson, F., 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. J. Bact., 66, 24-26.
6. Janse, J. D., 1991. Infra- and intra-specific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty-acid analysis. Systematic and Applied Microbiology 14; 335-345.
7. Janse, J. D. e J. Van Vaerenbergh. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (*Corynebacterium sepedonicum*) in potato. EPPO Bol., N.o 17, 1987, pp. 1-10.
8. Jansing, H. e K. Rudolph, 1998. Physiological capabilities of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* and development of a semi-selective medium. Journal of Plant Diseases and Protection, 105, 590-601.

9. Kovacs, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature, Lond., 178, 703.
10. Klement Z.; Rudolph, K e D. C. Sands, 1990. Methods in Phytobacteriology. Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 pp.
11. Lelliott, R. A., 1966. The plant pathogenic coryneform bacteria. J. appl. Bact., 29, 114-118.
12. Lelliott, R. A., E. Billing e A. C. Hayward, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads J. appl. Bact., 29, 470-489.
13. Lelliott, R. A. e P. W., Sellar, 1976. The detection of latent ring rot (*Corynebacterium sepedonicum* (Spiek. et Kotth.) Skapt. et Burkh.) in potato stocks. EPPO Bol. 6 (2), 101-106.
14. Li, X. e S.H. de Boer, 1995. Selection of Polymerase Chain Reaction primers from RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Phytopathology, 85, 837-842.
15. Mills, D., Russell, B., W. e J., W. Hanus, 1997. Specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* by amplification of three unique DNA sequences isolated by subtraction hybridization. Phytopathology, 87, 8, 853-861.
16. Pstrik, K. -H. e R.A. Rainey. 1999. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. J. Phytopathology 147; 687-693.
17. 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. e Knorr, D. (1999) Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system. Plant Disease 83; 1095-1100.
20. Schaad, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Schaad [Hrsg.]. -3. ed.; St. Paul, Minnesota:, 373 pp.
21. Skerman, V. B. D., 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria. 2nd ed., William and Wilkins Company, Baltimore.
22. Smith, N. C.; Hennesy, J; Stead, D.E., 2001. 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. e V. G. Collins, 1974. A study in test reproductibility between laboratories: report of Pseudomonas working party. Antonie van Leeuwenhoek, 40, 481-527.
24. Stead, D.E. 1992. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty-acid profiles. International Journal of Systematic Bacteriology 42; 281-295.
25. Wullings, B. A.; van Beuningen, A. R.; Janse, J. D. e A. D. L. Akkermans, 1998. Detection of *Ralstonia solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent *in situ* hybridization with 23s rRNA-targeted probes. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4546-4554.

## ANEXO II

### Ocorrência suspeita e confirmação da presença do organismo prejudicial

1 — Para cada ocorrência suspeita relativamente à qual tenha sido identificado um resultado positivo no ou nos testes de rastreio, de acordo com os métodos estabelecidos no anexo I, e na pendência da confirmação ou refutação da presença do organismo prejudicial, através do método referido, deve-se proceder à retenção e conservação adequada, até à conclusão das análises dos métodos referidos, de:

1.1 — Todos os tubérculos e, sempre que possível, todas as plantas sujeitos a amostragem;

1.2 — Qualquer extracto restante e outro material preparado para o ou os testes de rastreio, por exemplo, lâminas de imunofluorescência; e

1.3 — Toda a documentação relevante.

*Nota:*

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

2 — Em caso de confirmação da presença do organismo prejudicial, deve-se proceder à retenção e à conservação adequada, durante pelo menos um mês após a comunicação referida no n.º 2 do artigo 6.º:

2.1 — Do material referido no n.º 1;

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

2.3 — De uma cultura isolada do referido organismo.

### ANEXO III

#### Determinação da extensão da contaminação provável e da possível dispersão do organismo prejudicial

1 — Os elementos a considerar na determinação da extensão da contaminação provável, nos termos da alínea *d*) do n.º 1 do artigo 6.º, incluem:

1.1 — Tubérculos ou plantas cultivadas no local de produção declarado contaminado, nos termos da alínea *b*) do n.º 1 do artigo 6.º;

1.2 — Local ou locais de produção com alguma relação de produção com os tubérculos ou plantas declarados contaminados nos termos da alínea *b*) do n.º 1 do artigo 6.º, incluindo aqueles que partilham equipamento e instalações de produção directamente ou através de um contratante comum;

1.3 — Tubérculos ou plantas produzidos no local ou locais de produção referidos no número anterior ou presentes nesse local de produção durante o período em que os tubérculos ou plantas declarados contaminados, nos termos da alínea *b*) do n.º 1 do artigo 6.º, se encontravam no local de produção referido no n.º 1.1;

1.4 — Instalações que manuseiem batatas provenientes dos locais de produção referidos nos números anteriores;

1.5 — Quaisquer máquinas, veículos, recipientes, armazéns ou respectivas partes e quaisquer outros objectos, incluindo material de embalagem, que possam ter estado em contacto com os tubérculos ou com as batateiras declarados contaminados ao abrigo da alínea *b*) do n.º 1 do artigo 6.º;

1.6 — Todos os tubérculos ou plantas armazenados em, ou em contacto com, quaisquer estruturas ou objectos constantes do número anterior, antes da limpeza e desinfectação dessas estruturas ou objectos;

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

1.8 — Local ou locais de produção de tubérculos e batateiras referidos no número anterior.

2 — Os elementos a considerar na determinação da possível dispersão, nos termos da alínea *e)* do n.º 1 do artigo 6.º, incluem:

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

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

3 — A comunicação a que se refere n.º 2 do artigo 6.º, contém os seguintes dados:

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

3.1.1 — O nome da variedade do lote de batatas;

3.1.2 — O tipo (de consumo, de semente, etc.) e, sempre que aplicável, a categoria da batata-semente.



3.2 — Sempre que se verificar um risco de contaminação de batatas provenientes ou com destino a qualquer outro Estado membro, a DGPC, após a confirmação da ocorrência, comunica imediatamente os organismos responsáveis dos Estados membros em questão, bem como à Comissão Europeia, com a informação necessária, tal como:

3.2.1 — O nome da variedade do lote de batatas;

3.2.2 — O nome e o endereço do expedidor e do destinatário;

3.2.3 — A data da entrega do lote de batatas;

3.2.4 — A dimensão do lote de batatas entregue;

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

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

3.3.1 — A data de confirmação da contaminação;

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

3.3.3 — Informação sobre as fontes de contaminação identificadas ou presumidas;

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

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

3.3.6 — Quaisquer outras informações relacionadas com o ou os surtos confirmados que a Comissão Europeia venha a solicitar.

## ANEXO IV

### Aplicação de medidas de protecção fitossanitária sob controlo oficial

- 1 — As medidas sob controlo oficial a que se refere o n.º 1 do artigo 7.º, consistem:
  - 1.1 — Na utilização para a alimentação animal após tratamento térmico que garanta a impossibilidade de sobrevivência do organismo prejudicial; ou
  - 1.2 — Na eliminação num local adequado e oficialmente aprovado em que não existam riscos identificáveis de fuga do patógeno para o ambiente, por exemplo, através de escorrência para terras agrícolas; ou
  - 1.3 — Na incineração; ou
  - 1.4 — Na transformação industrial através de entrega directa e imediata a uma unidade de transformação com instalações de eliminação de resíduos oficialmente aprovadas, relativamente aos quais se tenha concluído pela não existência de qualquer risco identificável de propagação do organismo prejudicial, e com um sistema de limpeza e desinfectação, pelo menos, dos veículos de transporte que saem da referida unidade; ou
  - 1.5 — Noutras medidas, desde que se tenha concluído que não existe qualquer risco identificável de propagação do organismo, sendo essas medidas, bem como a respectiva justificação, comunicadas à Comissão Europeia e aos restantes Estados membros.
  - 1.6 — Em que qualquer resíduo restante associado e com origem nos procedimentos mencionados nos números anteriores são eliminados através de métodos aprovados oficialmente, em conformidade com o disposto no anexo V.

2 — A utilização ou eliminação adequada dos tubérculos ou das batateiras considerados como provavelmente contaminados, ao abrigo da alínea *d*) do n.º 1 do artigo 6.º, e a que se refere o n.º 2 do artigo 7.º, sob controlo dos serviços de inspecção fitossanitária da DRA competente, e se for caso, com a devida comunicação aos serviços de inspecção das outras DRA envolvidas de forma a garantir esse controlo a todo o momento, bem como, se for caso disso, mediante aprovação do organismo oficial responsável do Estado membro a que a batata se destine e no qual irá ser embalada ou transformada, no que diz respeito às instalações de eliminação de resíduos a que se referem os n.ºs 1.1 e 1.2, é:

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

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

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

3 — Os métodos adequados de limpeza e desinfecção dos objectos referidos no n.º 3 do artigo 7.º, devem ser aqueles relativamente aos quais se concluiu que não existe qualquer risco identificável de dispersão do organismo prejudicial, devendo ser utilizados sob controlo dos serviços de inspecção fitossanitária da DRA competente.

4 — A série de medidas a aplicar pelos serviços de inspecção fitossanitária da DRA competente na zona demarcada, estabelecida nos termos da alínea *e*) do n.º 1 do artigo 6.º, e a que se refere o n.º 4 do artigo 7.º, inclui as seguintes acções:

4.1 — Nos locais de produção declarados contaminados nos termos da alínea *b*) do n.º 1 do artigo 6.º:

4.1.1 — Num campo declarado contaminado nos termos da alínea *b*) do n.º 1 do artigo 6.º, quer:

*a*) Durante, pelo menos, os três anos de cultura seguintes ao da declaração de contaminação:

*i*) Adopção de medidas destinadas a eliminar as batateiras espontâneas e outras plantas hospedeiras naturais do organismo prejudicial; e

*ii*) Proibição de plantar tubérculos, plantas ou sementes verdadeiras de batateira, ou outras plantas que possam ser um hospedeiro natural do organismo prejudicial, ou culturas relativamente às quais exista um risco identificado de dispersão do organismo prejudicial;

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

*iv)* No período de colheita de batata seguinte ao referido na subalínea anterior e após um ciclo de rotação adequado, que é de no mínimo dois anos caso se cultivem batatas, podem ser plantadas batatas, tanto para a produção de batata de semente como de batata de consumo, e é efectuada uma prospecção oficial nos termos do artigo 3.º

*b)* Durante os quatro anos de cultura seguintes ao da declaração de contaminação:

*i)* Adopção de medidas destinadas a eliminar as batateiras espontâneas e outras plantas hospedeiras naturais do organismo prejudicial, e

*ii)* Colocação e manutenção do campo em pousio ou em pastagem permanente com pastoreio intensivo ou com cortes curtos frequentes;

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

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

a) No ano de cultura seguinte ao da declaração de contaminação não são plantados tubérculos, plantas ou sementes verdadeiras de batateira nem qualquer outra planta que possa constituir um hospedeiro natural do organismo prejudicial, podendo ser plantadas batatas de semente certificadas, apenas para a produção de batata de consumo;

b) No segundo ano de cultura seguinte ao da declaração de contaminação só são plantadas, para obtenção de semente ou de batata para consumo, batatas de semente certificadas ou oficialmente testadas para determinar a ausência da podridão anelar e cultivadas sob controlo oficial em locais de produção, à excepção daqueles a que se refere o n.º 4.1.1;

c) Pelo menos durante o terceiro ano de cultivo após a declaração de contaminação, só são plantadas, para obtenção de semente ou de batata para consumo, batatas de semente certificadas ou cultivadas sob controlo oficial, a partir de batatas de semente certificadas;

d) Em cada um dos anos de cultivo referidos nas alíneas anteriores, são tomadas medidas para eliminar batateiras espontâneas e outras plantas hospedeiras naturais do organismo prejudicial, caso surjam, e são efectuados testes oficiais às batatas colhidas em cada campo, em conformidade com o procedimento constante do anexo I;

4.1.3 — Imediatamente após a declaração de contaminação, nos termos da alínea b) do n.º 1 do artigo 6.º, e após o primeiro ano de cultura seguinte, toda a maquinaria e instalações de armazenamento existentes no local de produção e ligadas à produção de batata são limpas e desinfectadas, de modo adequado utilizando métodos apropriados, nos termos do n.º 3;

4.1.4 — Numa unidade de produção de culturas protegidas em que seja possível a substituição completa do meio de cultura:

a) Não são plantados tubérculos, plantas ou sementes verdadeiras de batateira, a não ser que a unidade de produção tenha sido sujeita a medidas oficialmente controladas destinadas a eliminar o organismo prejudicial e a retirar qualquer material de plantas hospedeiras, incluindo, pelo menos, uma mudança completa do meio de cultura e a limpeza e desinfecção da unidade de produção e de todo o equipamento e, em seguida, que os serviços de inspeção fitossanitária da DRAP competente tenham concedido a aprovação para a produção de batata; e

b) A produção de batata é realizada a partir de batata de semente certificada ou de mini-tubérculos ou de micro-plantas provenientes de fontes testadas.

4.2 — Na zona demarcada, sem prejuízo das medidas a que se refere o n.º 4.1, os serviços de inspeção fitossanitária da DRAP competente:

4.2.1 — Exigem, imediatamente após a declaração de contaminação, a limpeza e desinfecção de toda a maquinaria e dos armazéns das referidas instalações envolvidas na produção da batata, consoante for apropriado, utilizando métodos adequados, tal como disposto no n.º 3;

4.2.2 — Imediatamente após a declaração de contaminação e durante, pelo menos, três anos de cultura:

i) Controlam, através dos serviços de inspeção, as explorações que cultivem, armazenem ou manuseiem tubérculos de batata, assim como as explorações que utilizem para o efeito maquinaria em regime de contratação;



*ii)* Exigem, para todas as culturas de batata da zona, que só sejam plantadas batatas de semente certificadas ou sementes cultivadas sob controlo oficial e que sejam analisadas após colheita as culturas de batata de semente efectuadas em locais de produção declarados como provavelmente contaminados nos termos da alínea *d)* do n.º 1 do artigo 6.º;

*iii)* Exigem que os lotes de batata de semente e de batata de consumo colhidos na zona sejam manuseadas separadamente ou um sistema de limpeza e desinfeção entre o manuseamento de lotes para semente e para consumo;

*iv)* Realizam uma prospecção oficial nos termos do artigo 3.º;

4.2.3 — Estabelecem, quando adequado, um programa de substituição de todos os lotes de batata semente ao longo de um período adequado.

## ANEXO V

### Eliminação de resíduos associáveis ao organismo prejudicial

1 — Os métodos de eliminação de resíduos oficialmente aprovados referidos no n.º 1 do anexo IV devem cumprir as seguintes disposições de forma a prevenir qualquer risco identificável de dispersão do organismo prejudicial:

1.1 — Os resíduos de batata (incluindo batatas rejeitadas e cascas de batata) e quaisquer outros resíduos sólidos associados às batatas (incluindo terra, pedras e outro detritos) são eliminados:

1.1.1 — Num local de eliminação adequado e oficialmente aprovado em que não existam riscos identificáveis de fuga do organismo prejudicial para o ambiente, por exemplo, através de escorrência para terras agrícolas, sendo os resíduos enviados directamente para o local em condições de confinamento de forma a que não exista risco de perda de resíduos; ou

1.1.2 — Por incineração; ou

1.1.3 — Por outras medidas, desde que se tenha concluído que não existe qualquer risco identificável de propagação do organismo prejudicial, sendo essas medidas comunicadas à Comissão Europeia e aos outros Estados membros.

1.2 — Antes da eliminação, os resíduos líquidos contendo sólidos em suspensão são sujeitos a filtração ou processos de decantação para remover tais sólidos, os quais são eliminados em conformidade com o referido no n.º 1.1.

1.2.1 — Os resíduos líquidos são, então:

a) Aquecidos a uma temperatura mínima de 60° C atingida em todo o volume durante, pelo menos, 30 minutos antes da eliminação; ou

b) Eliminados através de outro método sujeito a aprovação e controlo oficial, por forma a que não exista nenhum risco identificável de que os resíduos possam entrar em contacto com as terras agrícolas, devendo os respectivos pormenores ser comunicados aos restantes Estados membros e à Comissão Europeia.

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