

DIRETTIVA TAL-KUMMISSJONI 2006/63/KE**ta' l-14 ta' lulju 2006****li temenda lill-Annessi II sa VII tad-Direttiva tal-Kunsill 98/57/KE dwar il-kontroll ta' *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.***

IL-KUMMISSJONI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ

elementi tekniċi tal-proċeduri ta' identifikazzjoni u għarfien, u metodi ta' għarfien u identifikazzjoni ta' organiżmi fi pjanti ta' provenjenza hlief il-patata, u fl-ilma u hamrija, ġew inklużi wkoll;

Wara li kkunsidrat it-Trattat li jstabbilixxi l-Komunità Ewropea,

Wara li kkunsidrat id-Direttiva tal-Kunsill 98/57/KE ta' l-20 ta' Lulju 1998 ⁽¹⁾ dwar il-kontroll ta' *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, partikolarment Artikolu 11 tagħha,

- (7) Fir-rigward ta' l-elementi tekniċi tal-miżuri ta' kontroll, saru dispożizzjonijiet aħjar għall-: mod ta' konservazzjoni ta' kampjuni eżaminati sabiex ikun aċċertat li wiehed jista' jmur lura għall-organiżmu provenjenti, elementi meħtieġa sabiex wiehed jasal għall-istat ta' kontaminazzjoni, dettalji tan-notifikazzjoni tal-preżenza kkonfermata ta' l-organiżmu u tal-firxa kkontaminata, miżuri implimentati f'postijiet ta' produzzjoni mmarkati kkontaminati u li jaqgħu taħt medda ta' territorji mmarkati. Kif ukoll, ċertu dispożizzjonijiet għat-tadam ġew imfassla sabiex jittiehdu aktar in konsiderazzjoni r-relevanza ta' din il-pjanta bħala l-mezz ta' ghejxien għall-organiżmu;
- (8) Il-miżuri pprovduti f'din id-Deciżjoni huma konformi ma' l-oppinjoni tal-Kumitat Permanenti fuq is-Sahħa tal-Pjanta.

Billi:

- (1) Wiehed mill-organiżmi li huma ta' periklu għall-patata u t-tadam huwa *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, il-kawża patoġenika tal-marda tat-tahsir kannella fil-patata u tad-dbiel batterjoloġiku fil-patata u fit-tadam ("l-organiżmu");
- (2) L-organiżmu għadu jinstab f'ċerti partijiet tal-Komunità;
- (3) Id-Direttiva 98/57/KE stipolat miżuri dettaljati li għandhom jittiehdu fl-Istati Membri kontra l-organiżmu sabiex jiġi lokalizzat u tinstab id-distibuzzjoni tiegħu ssir prevenzjoni ta' l-okkorrenza u t-tixrid tiegħu; u jekk dan jinstab, issir prevenzjoni tat-tixrid u jsir kontroll bil-għan ta' l-eradikazzjoni tiegħu;
- (4) Minn dak iż-żmien, kien hemm bosta żviluppi sinjifikattivi fil-konnoxxenza tal-bijoloġija, fl-iskoperta u l-identifikazzjoni ta' l-organiżmu; aktar minn hekk esperjenzi prattiċi miksuba mill-kontroll ta' l-organiżmu jitolbu reviżjoni ta' bosta dispożizzjonijiet tekniċi relatati mal-miżuri ta' kontroll;
- (5) Riżultat ta' tali żvilupp, tinħass il-htieġa ta' reviżjoni u aġġornar tal-miżuri inklużi f'ċerti Annessi tad-Direttiva 98/57/KE;
- (6) Rigward proċeduri ta' għarfien u identifikazzjoni, il-metodu ta' ibridizzazzjoni florexxenti in-situ (FISH), metodu ta' għarfien modern, huwa inkorporat. Titjib fil-metodu ta' identifikazzjoni permezz ta' aggregazzjoni ma' l-enzimi polimeraze (PCR), kif ukoll titjib ta' varji

ADOZZAT DIN ID-DIRETTIVA:

Artikolu 1

Anness II sa VII tad-Direttiva 98/57/KE huma minn issa sostitwiti bit-test korrispondenti f'Anness ta' din id-Direttiva.

Artikolu 2

1. L-Istati Membri għandhom jadottaw u jipubblikaw, sal-31 ta' Marzu 2007 l-iktar, il-ligijiet, ir-regolamenti, u d-dispożizzjonijiet amministrattivi neċessarji sabiex jiġu f'konformità ma' din id-Direttiva. Huma għandhom, minghajr ebda telf ta' żmien, jikkomunikaw lill-Kummissjoni t-test ta' dawk id-dispożizzjonijiet u tabella li turi l-korrelazzjoni ta' bejn dawk id-dispożizzjonijiet u din id-Direttiva.

Huma għandhom japplikaw tali dispożizzjonijiet mill-1 ta' April 2007.

Meta Stati Membri jadottaw dawn id-dispożizzjonijiet, huma għandhom jinkludu referenza għal din id-Direttiva jew ikun hemm akkompanjament bit-tali referenza fl-okkażjoni tal-pubblikazzjoni uffiċjali tagħhom. L-Istati Membri għandhom jistabbilixxu kif għandha ssir referenza bħal din.

(1) ĠU L 235, tat-21.8.1998, p. 1.

2. Stati Membri għandhom jikkomunikaw mill-ewwel lill-Kummissjoni t-test tad-dispożizzjonijiet ewlenin tal-liġi naz-zjonali li huma jaddottaw fil-qasam kopert b'din id-Direttiva.

Artikolu 3

Din id-Direttiva għandha tidhol fis-seħh fit-tielet jum wara l-pubblikazzjoni tagħha fil-*Ġurnal Uffiċjali ta' l-Unjoni Ewropea*.

Artikolu 4

Din id-Direttiva hija ndirizzata lill-Istati Membri.

Magħmula fi Brussell, nhar l-14 ta' Lulju 2006.

Għall-Kummissjoni
Markos KYPRIANOU
Membri tal-Kummissjoni

ANNEX

"ANNEX II

**SKEMA TA' TESTIJET GHAD-DIJANJOSI U IDENTIFIKAZZJONI TA' RALSTONIA
SOLANACEARUM (SMITH) YABUUCHI ET AL.**

SKOP TA' L-ISKEMA TA' TESTIJET

L-iskema pprezentata tfassal il-proċeduri varjati involuti għall-:

- (i) Dijanjosi tat-tahsir kannella fil-patata u dbiel batterjoloġiku fit-tuberi tal-patata, fit-tadam u ċerti pjanti ta' provenjenza oħra;
- (ii) Għarfien ta' *Ralstonia solanacearum* f'kampjuni ta' tuberi tal-patata, patata, tadam u pjanti ospitanti oħrajn fl-ilma u fil-ħamrija;
- (iii) Identifikazzjoni ta' *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*).

WERREJ

	<i>Paġna</i>
	Prinċipji Ġenerali 40
TAQSIMA I	Applikar ta' l-iskema ta' testijiet 40
	1. Skema ta' għarfien għad-dijanjosi tat-tahsir kannella u dbiel batterjoloġiku (<i>R. solanacearum</i>) fit-tuberi tal-patata, tadam jew pjanti oħra ta' provenjenza li għandhom sintomi ta' tahsir kannella jew dbiel batterjoloġiku 40
	2. Skema għall-għarfien u identifikazzjoni ta' <i>R. solanacearum</i> f'kampjuni ta' tuberi ta' patata li ma jurux sintomi 43
	3. Skema għall-għarfien u identifikazzjoni ta' <i>R. solanacearum</i> f'kampjuni ta' tuberi ta' patata, pjanti tat-tadam u pjanti oħra ta' provenjenza li ma jurux sintomi 46
TAQSIMA II	Metodi fil-fond għall-għarfien ta' <i>R. solanacearum</i> f'kampjuni ta' tuberi ta' patata, tadam u pjanti oħra ta' provenjenza li jipprezentaw is-sintomi kollha ta' tahsir kannella u dbiel batterjoloġiku . 48
	1. Sintomi 48
	2. Testijiet ta' eżaminazzjoni qosra 48
	3. Proċeduri ta' izolazzjoni 49
	4. Testijiet ta' identifikazzjoni għal <i>R. solanacearum</i> 49
TAQSIMA III	1. Metodi dettaljati għall-għarfien u identifikazzjoni ta' <i>R. solanacearum</i> f'kampjuni ta' tuberi ta' patata li ma jurux sintomi 49
	1.1. Preparazzjoni tal-kampjun 49
	1.2. Testijiet 51
	2. Metodi dettaljati għall-għarfien u identifikazzjoni ta' <i>R. solanacearum</i> f'kampjuni ta' tuberi ta' patata, tadam u pjanti oħra ta' provenjenza li ma jurux sintomi 51
	2.1. Preparazzjoni tal-kampjun 51
	2.2. Testijiet 52
TAQSIMA IV	1. Skema għall-għarfien u identifikazzjoni ta' <i>R. solanacearum</i> fl-ilma 53
	2. Skema għall-għarfien u identifikazzjoni ta' <i>R. solanacearum</i> fl-ilma 55
	2.1. Preparazzjoni tal-kampjun 55
	2.2. Testijiet 55
TAQSIMA V	1. Skema għall-għarfien u identifikazzjoni ta' <i>R. solanacearum</i> fil-ħamrija 56
	2. Skema għall-għarfien u identifikazzjoni ta' <i>R. solanacearum</i> fil-ħamrija 58
	2.1. Preparazzjoni tal-kampjuni 58
	2.2. Testijiet 58

	Pàġna
TAQSIMA VI: Protokoll ottimizat għall-gharfien u identifikazzjoni ta' <i>R. solanacearum</i>	58
A) Testijiet ta' dijanjosi u għarfien	58
1. testijiet ta' separar u analiz taz-zkuk	58
2. Tfittxija ta' qmuh zghar ta' poly-β-hydroxybutyrate	58
3. Testijiet ta' tagħqid seroloġiku (Agglutination)	59
4. Iżolazzjoni selettiva	60
4.1. Pjastra selettiva	60
4.2. Proċedura ta' trobbija f'ambjent favorevoli	60
5. Test ta' l-immunofluworexxenza (Test IF)	61
6. Test tal-Polymerase chain reaction (Test PCR)	64
6.1. Metodi ta' purifikazzjoni tad-DNA	65
(a) Metodi skond Pastrik (2000)	65
(b) Metodi ohra	65
6.2. PCR	66
6.3. Analizi tal-prodott PCR	66
7. Test ta' l-ibridizzazzjoni fluwore67enti in situ (Test FISH)	67
8. Assay li huwa enzyme linked immuno sorbent (Tests ELISA)	69
(a) Indirett ELISA	69
(b) DASI ELISA (Double Antibody Sandwich Indirect)	70
9. Test Bioassay	71
B) Testijiet ta' identifikazzjoni	72
1. Testijiet ta' nutriment u identifikazzjoni permezz ta' enzimi	72
2. Test IF	72
3. Test ELISA	73
4. Test PCR	73
5. Test FISH	73
6. Identifikazzjoni skond it-tip ta' aċidi grassi (FAP)	73
7. Metodi ta' karatterizzazzjoni tal-varjeta'	73
7.1. Determinazzjoni Biovar	73
7.2. Tehid tal-marki tas-swaba Genomic	74
7.3. Metodi PCR	74
C) Test ta' Konferma	74
Appendiċi 1 Laboratorji involuti fl-ottimizazzjoni u l-validazzjoni tal-protokollu	76
Appendiċi 2 Medji għall-iżolazzjoni u kultivazzjoni ta' <i>R. solanacearum</i>	77
Appendiċi 3 (A) Materjal ta' kontroll standardizzat kummerċjalment disponibbli	79
(B) Prepazzjoni ta' kontrolli	80
Appendiċi 4 Buffers għall-proċeduri tat-testijiet	82
Appendiċi 5 Determinazzjoni tal-livell ta' kontaminazzjoni fit-testijiet IF u FISH	85
Appendiċi 6 Protokollu u reaġġenti tal-PCR validati	86
Appendiċi 7 Reaġġenti validati għat-test FISH	91
Appendiċi 8 Kundizzjonijiet ambjentali fit-trobbija għat-tadam u brungiel	93
Referenzi	94

PRINĊIPII ĠENERALI

Protokollu ottimizzati għall-metodi kollha, sustanzi reaġġenti validati u dettalji għall-preparazzjoni tat-test u materjali li jservu ta' kontroll jew tqabbil huma mfassla fl-Appendiċi. Lista tal-laboratorji li ġew inklużi fl-ottimizazzjoni u validazzjoni tal-protokollu huma pprovduti f'Appendiċi 1.

La l-protokollu ser jinvolvu għarfien ta' organiżmu fi kwarantena u ser jinkludu użu ta' gruppi mrobbija vijabilment ta' *R. solanacearum* bħala materjal ta' tqabbil, ser ikun hemm bżonn li jsiru ċerti proceduri taht kundizzjonijiet ta' kwarantena siewja bi faċilitajiet adegwati ta' skart u taht kundizzjonijiet ta' liċenzji approprijat kif imharrġa mill-awtoritajiet uffiċjali tal-kwarantena tal-pjanti.

Parametri ta' testijiet iridu jiżguraw livelli ta' għarfien ta' *R. solanacearum* li jkunu riproduċibbli u konsistenti sal-limiti ta' tali metodi magħżula.

Preparazzjoni ta' kontrolli pożittivi preċiżi hija ta' importanza primarja.

Testjar skond il-limiti meħtieġa tinkludi wkoll issettjar korrett, manutenzjoni u kalibrar tat-tagħmir, użu u preżervazzjoni bil-prudenza ta' sustanzi reaġġenti u kull miżuri meħtieġa sabiex jiġu evitati kontaminazzjonijiet bejn kampjuni, eż. Separar ta' kontrolli pożittivi minn kampjuni li qegħdin jiġu ttestjati. Miżuri ta' kontroll fuq kwalità jridu jiġu implimentati sabiex jiġu evitati żbalji amministrattivi u żbalji ohra speċjalment fl-immarkar u dokumentazzjoni.

Okkorrenza sospetta kif imfassla f'Artikolu 4 (2) fid-Direttiva 98/57/KE tirriżulta riżultatat pożittiv fit-testijiet ta' dijanjosi jew skrining fuq kampjun kif speċifikat fl-illustrazzjoni hawn isfel. Test ta' skrining li jirriżulta pożittiv l-ewwel darba (test IF, PCR/FISH, iżolazzjoni selettiva) jrid jiġi kkonfermat permezz tat-tieni test ta' skrining li huwa bbażat fuq principju ieħor bijoloġiku.

Jekk l-ewwel test ta' skrining huwa pożittiv, kontaminazzjoni bil-*R. solanacearum* hija sosopettat għalhekk test ieħor ta' skrining irid isir. Jekk it-tieni test ta' skrining huwa pożittiv, is-sospett huwa kkonfermat (preżenza kkonfermata) u t-testijiet skond l-iskema jridu jtkomplew. Jekk it-tieni test ta' skrining huwa negattiv, il-kampjun jiġi meqjus bħala mhux kontaminat bil-*R. solanacearum*.

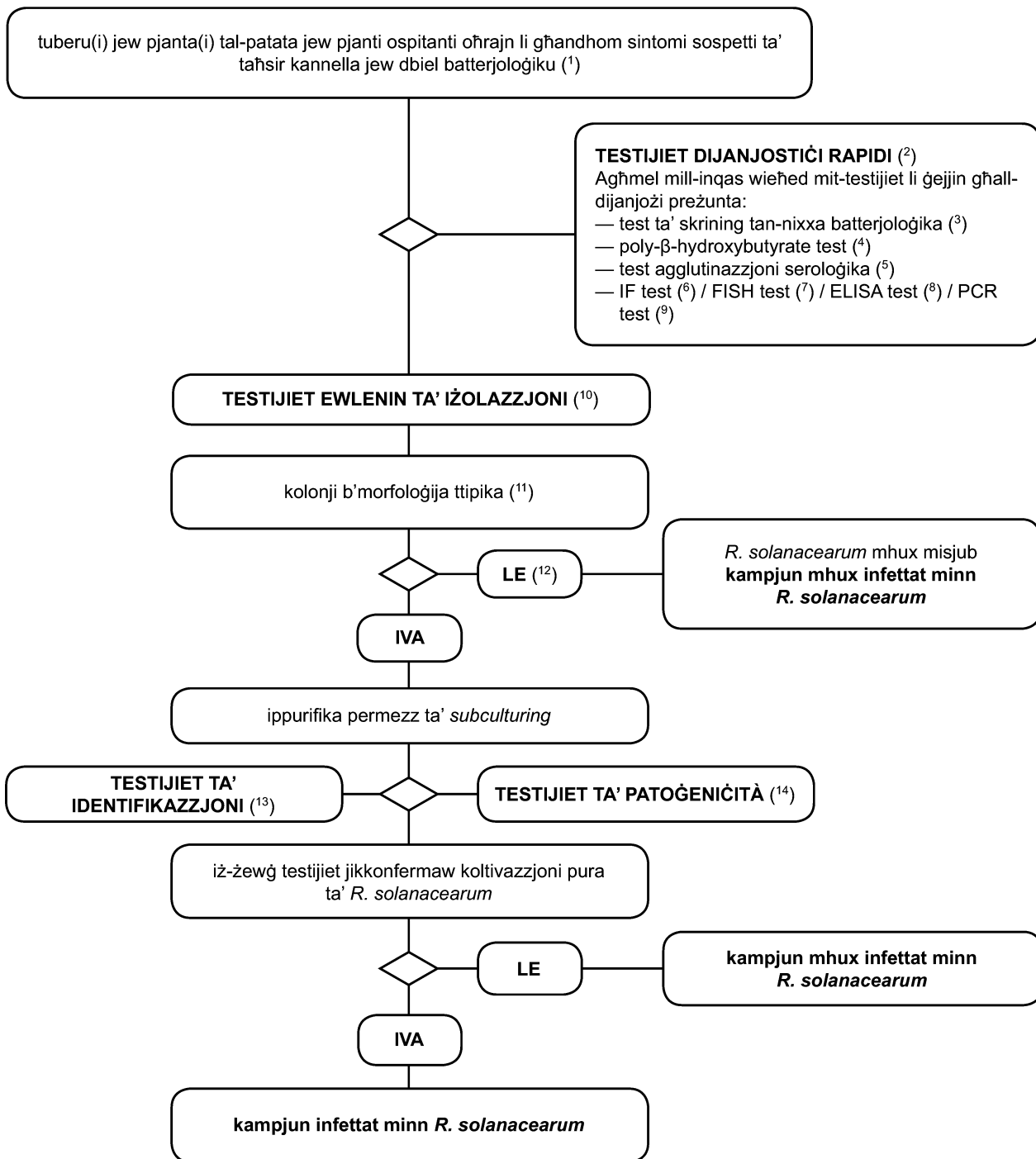
Preżenza kkonfermata kif imfassal f'artikolu 5 (1) fid-direrttiva 98/57/KE tirriżulta iżolazzjoni u identifikazzjoni ta' grupp safi ta' *R. solanacearum* bil-konferma ta' patoġenicità.

TAQSIMA I

APPLIKAR TA' L-ISKEMA TA' TESTIJET

1. **Skema ta' għarfien għad-dijanjosi tat-tahsir kannella u dbiel batterjoloġiku (*R. solanacearum*) fit-tuberi tal-patata, tadam jew pjanti ohra ta' provenjenza li għandhom sintomi ta' tahsir kannella jew dbiel batterjoloġiku**

Il-proċedura ta' testjar hija mfassla għall-pjanti tal-patata u pjanti li jippreżentaw sintomi ċari jew sospetti ta' tahsir kannella jew dbiel vaskulari. Din tinkludi skrining rapidu, iżolazzjoni tal-mikrobu patoġeniku mit-tessut vaskulari infettat fuq sustanza fejn huma biss jistgħu jikbru (selettiva) u, fil-każ ta' riżultatat pożittiv, identifikazzjoni tal-grupp ta' organiżmi in kwestjoni bħala *Ralstonia solanacearum*.



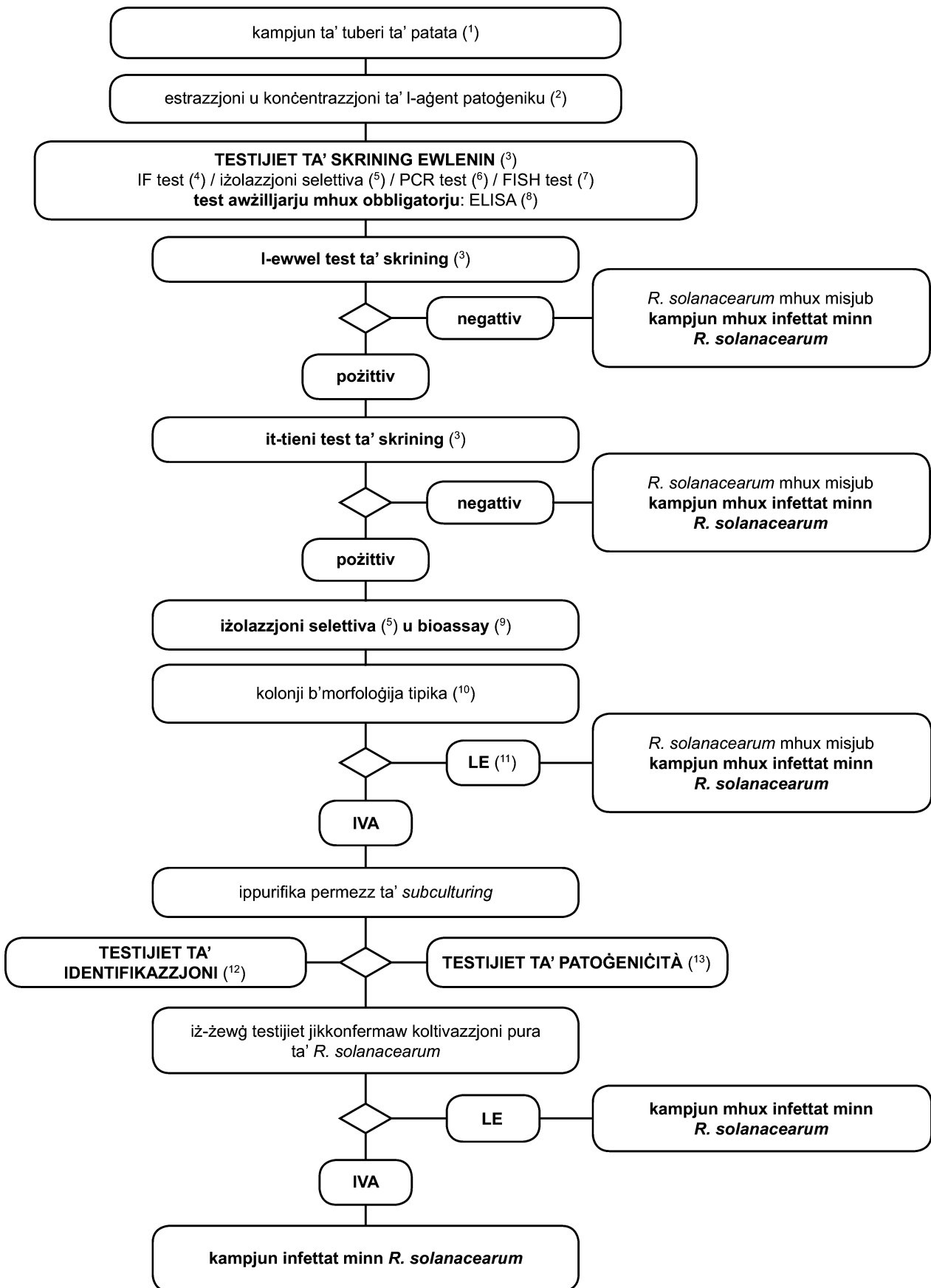
- (¹) għad-deskrizzjoni tas-sintomi are Taqsima II.1
- (²) Testijiet ta' dijanjosi rapida jiffaċilitaw dijanjosi preżunta iżda mhumiex essenzjali. Riżultat negattiv mhux dejjem jimplika assenza tal-mikrobu patoġeniku.
- (³) Testijiet ta' skrining għall-batterji li jnixxu minn tessuti vaskulari taz-zkuk huma imfassla f'Taqsima VI.A.1.
- (⁴) Testijiet għall-*polyβ-hydroxybutyrate* fi stat imrammel f'ċelluli tal-batterji huma mfassla f'Taqsima VI.A.2.
- (⁵) Testijiet ta' tagħqid seroloġiku fuq nixxa batterjoloġika jew estratti minn tessuti sintomatiċi huma imfassla f'Taqsima VI.A.3.
- (⁶) Test *IF* fuq nixxa batterjoloġika sospiża fl-ilma jew f'tessuti sintomatiċi huwa imfassal f'Taqsima VI.A.5.
- (⁷) Test *FISH* fuq nixxa batterjoloġika sospiża fl-ilma jew f'tessuti sintomatiċi huwa imfassal f'Taqsima VI.A.7.
- (⁸) Test *ELISA* fuq nixxa batterjoloġika sospiża fl-ilma jew f'tessuti sintomatiċi huwa mfassal f'Taqsima VI.A.8.
- (⁹) Test *PCR* fuq nixxa batterjoloġika sospiża fl-ilma jew f'tessuti sintomatiċi huwa mfassal f'Taqsima VI.A.6.
- (¹⁰) Il-mikrobu patoġeniku huwa iżolat faċilment minn materjal ta' pjanti sintomatiċi permezz ta' kiswa dilwita (Taqsima II.3).
- (¹¹) Morfoloġija tipika tal-kolonja hija mfassla f'Taqsima II.3.d.
- (¹²) It-trobbija tista' ma tirnax minn livelli avvanzati ta' infezzjoni minhabba kompetizzjoni jew taħkim minn batterji saprofitiċi. Jekk is-sintomi ta' infezzjoni huma ċari, iżda t-test ta' iżolazzjoni jirriżulta negattiv, l-iżolazzjoni trid terġa' issir, preferibbilment permezz ta' kiswa selettiva.
- (¹³) Identifikazzjoni korretta ta' gruppi safja ta' organiżmi iżolati preżunti *R.solanacearum* għandha ssir permezz tat-testijiet deskritti fit-Taqsima VI.B. Karatterizzazzjoni subspeċifika mhix obbligatorja iżda ta' min issir għal kull każ ġdid.
- (¹⁴) It-test ta' patoġeniċità huwa mfassal f'Taqsima VI.C.

2. **Skema għall-gharfien u identifikazzjoni ta' *Ralstonia solanacearum* f'kampjuni ta' pjanti ta' patata li ma jurux sintomi**

Prinċipju:

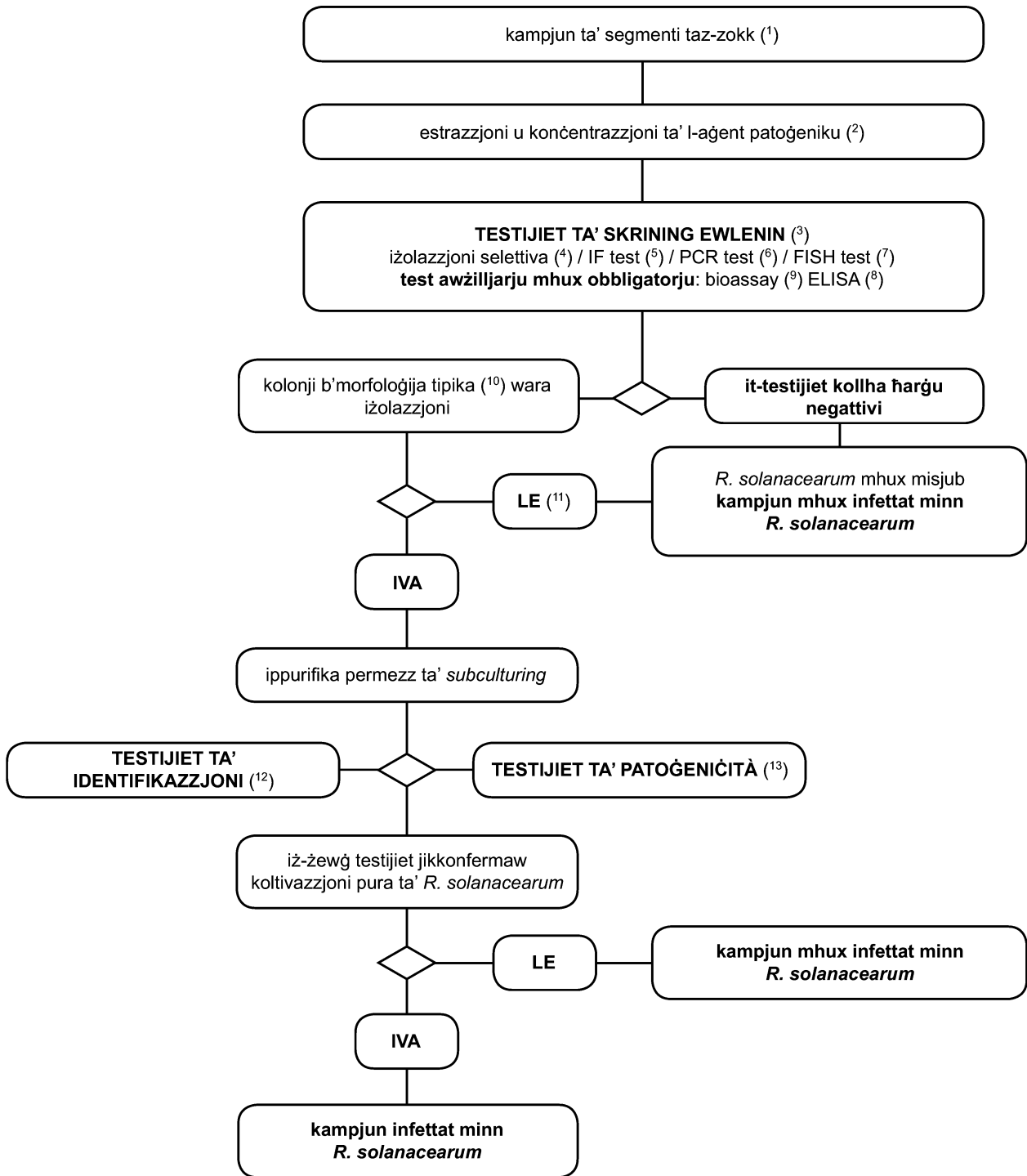
Il-proċedura tat-testjar hija intiża sabiex issir l-iskoperta ta' infezzjoni moħbija fit-tuberi tal-patata. Riżultat pożittiv minn mill-inqas żewġ testijiet ta' skringing³, ibbażati fuq prinċipji bijoloġiċi differenti, għandhom isiru bl-iżolazzjoni ta' l-organizmi patoġeniċi; u dan għandu jigi segwit, fil-każ ta' iżolazzjoni ta' kolonji tipiċi, mill-konferma ta' kolonja safja ta' *R. Solanacearum*. Riżultat pożittiv minn test ta' skringing wiehed biss mhux biżżejjed sabiex il-kampjun jitqies bħala suspett.

Testijiet ta' skringing u iżolazzjoni jridu jagħtu għarfien ta' 10^3 sa 10^4 ċellula/ml ta' residwu risospiz (*resuspended pellet*) inkluża bħala kontroll pożittiv f'kull serje ta' testijiet.



- (¹) Id-daqs standard huwa ta' 200 pjanta, għalkemm il-proċeduri jistgħu jintużaw bi kampjuni iżgħar jekk 200 pjanta mhumiex disponibbli.
- (²) Metodi ta' estrazzjoni tal-mikrobu patoġeniku u metodi ta' konċentrazzjoni huma imfassla f'Taqsimi III.1.1.
- (³) Jekk mill-inqas żewġ testijiet ibbażati fuq prinċipji bijoloġiċi joħroġu pożittivi, iżolazzjoni u test ta' konferma jridu jsiru. Jrid isir mill-inqas test ta' skrinjng wieħed. Meta tali test joħroġ negattiv il-kampjun jiġi meqjus negattiv. Jekk dan it-test joħroġ pożittiv it-tieni jew iktar testijiet ta' skrinjng ibbażati fuq prinċipji bijoloġiċi differenti oħra jridu jsiru sabiex ir-riżultat pożittiv jiġi vverifikat. Jekk it-tieni test jew testijiet oħra jirriżultaw negattivi, il-kampjun huwa meqjus bħala negattiv. Testijiet oħra mhumiex meħtieġa.
- (⁴) It-test ta' *IF* huwa mfassal f'Taqsimi VI.A.5.
- (⁵) It-test ta' iżolazzjoni selektiv huwa mfassal f'Taqsimi VI.A.4.
- (⁶) It-test tal-*PCR* huwa imfassal f'Taqsimi VI.A.6.
- (⁷) It-test ta' *FISH* huwa mfassal f'Taqsimi VI.A.7.
- (⁸) It-test ta' *ELISA* huwa imfassal f'Taqsimi VI.A.8.
- (⁹) It-test tal-*bioassay* huwa mfassal f'Taqsimi VI.A.9.
- (¹⁰) Morfoloġija tipika tal-kolonja hija mfassla f'Taqsimi II.3.d.
- (¹¹) Trobbija jew *bioassay* jistgħu ma jirnexxux minhabba kompetizzjoni jew inħibizzjoni minn batterji saprofitiċi. Jekk jinkisbu riżultati ċari u pożittivi fil-*bioassay*, iżda t-testijiet ta' iżolazzjoni huma negattivi, irrepeti it-test ta' iżolazzjoni mill-istess residwu jew billi jittieħdu aftar tessuti vaskulari min-naħa ta' l-għarqub minn tuberu maqtuġh mill-istess kampjun u, jekk hemm il-ħtieġa, jiġu ttestjati kampjuni oħra.
- (¹²) Identifikazzjoni korretta ta' gruppi safja ta' organiżmi iżolati preżunti *R.solanacearum* għandha ssir permezz tat-testijiet deskritti fit-Taqsimi VI.B.
- (¹³) It-test ta' patoġeniċità huwa mfassal f'Taqsimi VI.C.

3. Skema għall-għarfien u identifikazzjoni ta' *Ralstonia solanacearum* f'kampjuni ta' tuberi ta' patata, tadam u pjanti oħra ta' provenjenza li ma jurux sintomi



- (¹) Ara Taqsima III.2.1. għan-numri kontenuti fil-kampjuni li huma irrikkmandati.
- (²) Metodi ta' estrazzjoni tal-mikrobu patoġeniku u metodi ta' konċentrazzjoni huma mfassla f'Taqsima III.2.1
- (³) Jekk mill-inqas żewġ testijiet ibbażati fuq prinċipji bijoloġiċi joħroġu pożittivi, iżolazzjoni u test ta' konferma jridu jsiru. Jrid isir mill-inqas test ta' skринing wieħed. Meta tali test joħroġ negattiv il-kampjun jiġi meqjus negattiv. Jekk dan it-test joħroġ pożittiv it-tieni jew iktar testijiet ta' skринing ibbażati fuq prinċipji bijoloġiċi differenti oħra jridu jsiru sabiex ir-riżultat pożittiv jiġi vverifikat. Jekk it-tieni test jew testijiet oħra jirriżultaw negattivi, il-kampjun huwa meqjus bħala negattiv. Testijiet oħra mhumiex meħtieġa.
- (⁴) It-test ta' iżolazzjoni selettiv huwa mfassal f'Taqsima VI.A.4.
- (⁵) It-test ta' *IF* huwa mfassal f'Taqsima VI.A.5.
- (⁶) It-test tal-*PCR* huwa mfassal f'Taqsima VI.A.6.
- (⁷) It-test ta' *FISH* huwa mfassal f'Taqsima VI.A.7.
- (⁸) It-test ta' *I-ELISA* huwa mfassal f'Taqsima VI.A.8.
- (⁹) It-test tal-*bioassay* huwa mfassal f'Taqsima VI.A.9.
- (¹⁰) Morfoloġija tipika tal-kolonja hija mfassla f'Taqsima II.3.d.
- (¹¹) Trobbija jew *bioassay* jistgħu ma jirnexxux minħabba kompetizzjoni jew inħibizzjoni minn batterji saprofitiċi. Jekk jinkisbu riżultati pożittivi fit-testijiet ta' skринing, iżda t-test ta' iżolazzjoni joħroġ negattiv, irrepeti it-test ta' iżolazzjoni.
- (¹²) Identifikazzjoni korretta ta' gruppi safja ta' organiżmi iżolati preżunti *R.solanacearum* tinkiseb permezz tat-testijiet mfassla f'Taqsima VI.B.
- (¹³) It-test ta' patoġeniċità huwa mfassal f'Taqsima VI.C.

TAQSIMA II

METODI FIL-FOND GHALL-GHARFIEN TA' RALSTONIA SOLANACEARUM FKAMPJUNI TA' TUBERI TA' PATATA, TADAM U PJANTI OHRA TA' PROVENJENZA LI JIPPREŻENTAW IS-SINTOMI KOLLHA TA' TAHSIR KANNELLA U TA' DBIEL BATTERJOLOĠIKU

1. **Sintomi** (ara l-portal <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.)

1.1. Is-Sintomi fil-patata

Il-pjanta tal-patata. L-ewwel stadju ta' infezzjoni fl-għelieqi hija innotata minhabba d-dbiel tal-weraq fin-naħa ta' fuq tal-pjanta ftemperaturi għoljin matul il-ġurnata bl-irkuprar matul il-lejl. Fl-ewwel fażijiet ta' dbiel il-weraq jibqgħu hodor, iżda 'l quddiem nekrozi safra u kannella tiżviluppa. Issir ukoll epinastija. Jidbiel xtieli separati jew il-pjanta kollha tasal fi stat irreversibli li tirriżulta fil-kollass u l-mewt tal-pjanta. It-tessut vaskulari minn zkuk maqtugħin transversalment minn pjanti li dbielu, għandu apparenza kannella u jkollhom nixxa ta' sustanza densa kawża tal-batterji jew wiehed jista' jara dan billi jagħfashom. Meta zokk maqtugħ jitleqgħed pozizzjoni wieqfa fl-ilma, traċċi ta' lghab jinxtardu mill-organi vaskulari.

It-tuberu tal-patata. It-tuberi tal-patata għandhom jinqatgħu trasversalment qrib l-għarqub (il-parti ta' l-istolon) jew longitudinalment il-fuq mill-parti ta' l-istolon. L-ewwel stadji ta' infezzjoni huma rikonoxxuti minn ċarar isfar fil-kannella tleqq tal-kulur taċ-ċirku vaskulari li minnu jnaxxi krema batterika spontanament wara ffit minuti. Il-quddiem dan it telf ta' kulur vaskulari jsir iktar ċar u distint lewn kannella u nekrozi tista' tinfirex fit-tessut taz-zokk madwar it-tessut vaskulari. Fi stadju avanzat, l-infezzjoni tinfirex min-naħa ta' isfel u l-imsiemer minn fejn inaxxi il-lghab ta' batterji li jista' jikkawża aderenza ta'frak ta' hamrija. Pjagi lewn aħmar lewn fuq il-kannella jistgħu jidhru fuq il-ġilda ta' barra minhabba tkissir ta' tessut vaskulari internament. Ohrajn infezzjonijiet sekondarji ta' moffa u thassir batterjoloġiku huma komuni fl-istadji avanzati tal-marda.

1.2. sintomi fit-tadam

Il-pjanta tat-tadam. L-ewwel sintomu vizibbli hija l-apparenza mitluqa tal-weraq iż-żgħar. F'ambjent favorevoli għall-organizmu patoġeniku (temperatura tal-hamrija 25 °C; umdità saturizzata), epinastija u dbiel fuq parti waħda jew fuq il-pjanta kollha fi żmien ffit granet li jwassal għall-kollass tal-pjanta. Fi kundizzjonijiet inqas favorevoli (temperatura tal-hamrija inqas minn 21 °C), isi inqas tidbil, iżda numru kbir ta' għerūq sekondarji jistgħu jidhru miz-zokk. Huwa possibli li wiehed jinnota strixxi imxarra ta' għerūq min-naħa ta' isfel taz-zokk li hija evidenza ta' nekrozi fis-sistemma vaskulari. Meta z-zokk jinqatgħa dritt, tessut kannella ċar jidher toħroġ nixxa ta' batterji saf-ranija minnhom.

1.3. sintomi fuq pjanti ohra li huma soġġetti

Pjanti Solanum dulcamara and S. nigrum. Taht kundizzjonijiet naturali, sintomi ta' tidbil huma rarament osservati f'dawn il-pjanti ta' haxix hażin sakemm it-temperatura tal-hamrija ma taqbiżx il-25 °C jew livelli ta' inoklu huma għolja hafna (eż. għal *S. nigrum* li jkber qrib hafna ta' pajnti tal-patata jew tat-tadam infettati. Meta jsir it-tidbil, is-sintomi huma kif imfassla għat-tadam. Pjanti ta' *S. dulcamara* li ma jidbielux li jikbru bl-għerūq u zkuk ġewwa l-ilma jistgħu jippreżentaw iċċarar vaskulari intern lewn kannella ċar meta wiehed josserva z-zokk fsezzjoni trażversali jew partijiet taz-zkuk taht l-ilma. Nixxa ta' batterji minn tessuti vaskulari maqtugħa jew għamla ta' lghab tinfirex fi hjut żgħar miz-zokk meta jitleqgħed fl-ilma pozizzjoni wieqfa, huma osservati ukoll fl-assenza ta' sintomi ta' tidbil.

2. **Testijiet ta' eżaminazzjoni qosra**

Testijiet ta' dijanjosi rapida jiffacilitaw dijanjosi preżunta iżda mhumiex essenzjali. Uża wiehed jew iktar minn dawn it-testijiet validati:

2.1. testijiet ta' separar u analiż taz-zkuk

(Ara Taqsima VI.A.1.)

2.2. Tfittxija ta' qmuħ zgħar ta' poly-β-hydroxybutyrate

Qmuħ karatteristiċi ta' PHB fiċ-ċelluli ta' *R. solanacearum* jistgħu jingħarfu billi jitleqgħu kampjuni, li jiġu iffissati bis-shana, tan-nixxa batterika minn tessut infettat fuq hġieġa taht mikroskopju permezz tal-kuluri *Nile Blu A* jew *Sudan Black* (Ara Taqsima VI.A.2.).

2.3. Testijiet ta' tagħqid seroloġiku (Agglutination)

(Ara Taqsima VI.A.3.)

2.4. Testijiet oħra

Testijiet oħrajn approprijati ta' skrinjng rapidu inkluż testijiet ta' IF (ara Taqsima VI.A.5.), it-test FISH (ara Taqsima VI.A.7.), testijiet ELISA (ara Taqsima VI.A.8.) u testijiet PCR (ara Taqsima VI.A.6).

3. Proċeduri ta' iżolazzjoni

- (a) Nehhi in-nixxa jew tessut iċċarat mid-dawra vaskulari fit-tuberu tal-patata jew mill-istrixxi vaskulari fiz-zkuk ta' patata, tadam jew pjanti li jservu li fuqhom iġixxu dawn l-organizmi li qegħdin jidbielu. Holl f'volum żgħir ta' ilma distillizat u sterilizzat jew 50mM ta' sustanza ta' fosfat li żżomm il-kundizzjonijiet stabbli (*buffer*) (Appendiċi 4) u halli għall-5-10 minuti.
- (b) Ipprepara serje ta' tahlitiet dilwiti li jkunu għaxar darbiet iktar minn xulxin.
- (c) Ittrasferixxi 50-100 µl tas-sospensjoni u d-dilwizzjonijiet fuq medju ta' nutriment ġenerali (NA, YPGA or SPA; ara l-Appendiċi 2) u/jew fuq il-medju tat-terazolju selettiv Kelman (Appendiċi 2) u/jew medju selettiv validat (eż SMSA; ara Appendiċi 2). Ifrex jew aghmel strixxa permezz ta' teknika ta' kiswa dilwita approprijata. Jekk huwa ta' utilità, ipprepara kampjuni miksija separati ta' tahlita dilwita ta' *R. solanacearum biovar 2* bħala kontroll biex wiehed iqisu bħala riżultat pożittiv.
- (d) Żomm il-kisjiet taht inkubazzjoni għal 2 – 6 ijiem fi 28 °C.
 - Fuq il-materjal ta' nutrijent ġenerali, iżolati aggressivi ta' *R. solanacearum* jiffurmaw kolonji tal-lewn abjad kulur il-krema apparenza perla u kompożizzjoni fluwida b'dawriet karatteristiċi fin-nofs. Varjazzjonijiet oħra mhux aggressivi ta' *R. solanacearum* jiffurmaw kolonji tondi mhux konsistenza fluwida, butirici li għandhom lewn kompletament abjad kulur il-krema.
 - Fuq it-tetraazoljum ta' Kelman u SMSA, iċ-ċirkji huma homor, kulur id-demmm. Varjazzjonijiet oħra mhux aggressivi ta' *R. solanacearum* jiffurmaw kolonji tondi mhux konsistenza fluwida, butirici li għandhom lewn kompletament ahmar skur.

4. Testijiet ta' identifikazzjoni għal *R. solanacearum*

Testijiet sabieħ jiġu kkonfermati l-identità ta' prezunti iżolati ta' *R. solanacearum* huma mfassla f'Taqsima VI.B.

TAQSIMA III

1. Metodi dettaljati għall-għarfien u identifikazzjoni ta' *Ralstonia solanacearum* f'kampjuni ta' tuberu ta' patata li ma jipprezentawx sintomi

1.1. Preparazzjoni tal-kampjun

Nota:

- Id-daqs standard tal-kampjun huwa ta' 200 tuberu per test. Aktar għbir ta' kampjuni intesiv jitlob iktar testijiet fuq kampjuni ta' dan id-daqs. Numri akbar ta' tuberu fil-kampjun iwasslu għal tfixkil jew interpretazzjoni diffiċli tar riżultati. Iżda, proċeduri jistgħu jiġu applikati konvenjentament fuq kampjuni b'inqas minn 200 tuberu fejn hemm inqas numru ta' tuberu disponibbli għall-użu.
- Validazzjoni għall-metodi ta' l-iskoperta kif imfassla hawn isfel hija bbażata fuq kampjuni ta' 200 tuberu.
- L-estratt mill-patata mfassal hawn isfel jista' jintuża wkoll biex wiehed jivverifika l-preżenza tal batterju *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* li huwa kawża ta' thassir fil-patata.

Pre trattament mhux obbligatorju fuq il-kampjun qabel ma jiġi ppreparat:

- (a) Inkubazzjoni tal-kampjuni f'temperatura ta' 25-30 °C, għal żmien ta' ġimghatejn qabel ma jsir it-testjar, sabieħ jitjiebu l-kundizzjonijiet għat-tkattir tal-popolazzjoni ta' *R. solanacearum*.
- (b) Aħsel it-tuberu. Aghmel użu minn disinfezzjanti approprijati (komposti tal-kloru fejn ser isir it-test tal-PCR sabieħ jinqered id-DNA eventwali ta' organizmu patoġeniku) u deterġenti bejn kull kampjun. Nixxef it-tuberu fl-arja. Din il-proċedura ta' hasil hija ta' użu partikulari (iżda mhux obbligatorja) għall-kampjuni li jipprezentaw eċċess ta' hamrija u jekk test PCR jew iżolazzjoni diretta jridu jsiru.

- 1.1.1. Nehhi permezz ta' xafra disinfectata jew sikkina tal-haxix il-qoxra fin-naħa ta' l-għarqub (*stolon*) ta' kull tuberu sabiex it-tessut vaskulari jiġi jidher. Aqta' b'attenzjoni biċċa qalba tat-tessut vaskulari fin-naħa ta' l-għarqub u żomm l-iktar ammont ta' tessut mhux vaskulari kemm jista' jkun. (ara l-portal <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Nota: Ifred mill-ohrajn it-tuberi (mhassra: erfa' (Petra Muller) it-tuberi li għandhom xi sintomi ta' tahsir kannella sospetti u ttestja separatament.

Jekk matul it-tnehhija ta' l-għarqub jiġu osservati sintomi sospetti tat-tahsir kannella spezzjoni viżwali tat-tuberu għandha ssir u t-tuberu għandu jinqata' min-naħa ta' l-għarqub. Kull tuberu maqtugħ li għandu sintomi sospetti għandu jinħażen għall-jumejn temperatura ambjentali sabiex tista' sir is-suberizzazzjoni u ahžen f'refrigerazzjoni fi (at 4 - 10 °C) f'kundizzjonijiet ta' kwarantena xierqa. It-tuberi kollha inkluzi dawk li għandhom sintomi sospetti jridu jinżammu skond m'hu imfassal f'Annex III.

- 1.1.2. Iġbor il-qlub meħudin minn-naħa ta' l-għarqub tat-tuberu f'recipjent mhux użati li jintrema' (*disposable*) wara li jintuza u li jista' jingħalaq u/jew jiġu ssiġillati (jekk recipjenti jintużaw iktar minn darba jridu jtnaddaf sew u jiġi disinfectat permezz ta' komposti bbażati fuq il-kloru). Jekk jista' jkun, qlub tan-naħa ta' l-għarqub tat-tuberu jridu jiġu pproċessati mill-ewwel. Jekk dan ma jstax ikun, erfagħhom fil-kontenitur, mingħajr ma jiżdedu sostanzi li jżommu l-kundizzjonijiet stabbli (*buffer*), ambjent refriġerat għal żmien ta' mhux iktar minn 72 siegħa jew għal żmien ta' mhux iktar minn 24 siegħa f'temperatura ambjentali.

Ipproċessa l-qlub tan-naħa ta' l-għarqub tat-tuberu permezz ta' wieħed minn dawn il-proċeduri li ġejjin:

- (a) Poġġi l-qlub f'ammont (approssimativament 40ml) suffiċjenti ta' kimika li żżomm il-kundizzjonijiet kimiċi stabbli (Appendiċi 4) u hawwad permezz ta' apparat rotatorju (50-100rpm) għal erbgha sigħat f'temperatura inqas minn 24 °C jew miżmuma għal 16 – 24 siegħa refriġerati.

jew

- (b) Omoġenizza l-qlub b'ammont suffiċjenti (approssimativament 40ml) ta' kimika li żżomm il-kundizzjonijiet kimiċi stabbli waqt l-estrazzjoni (*extraction buffer*) (Appendiċi 4), f'apparat li jintuza għat-tahlit (eż *Waring jew Ultra Thurax*) jew billi jitgħaffgu f'borża għall-immacerazzjoni li tintrema wara l-użu tagħha (eż *Stomacher or Bioreba polyethene* ta' kalibru qawwi, 150 mm × 250 mm; sterilizzat bir-radjazzjoni) permezz ta' mazza tal-lasktu jew apparat għat-tahna xieraq (eż *Homex*).

Nota: Ir-riskju ta' kontaminazzjoni huwa għoli meta l-kampjuni huma omoġenizzati permezz ta' apparat għat-tahlit. Hu prekawzjonijiet sabiex jiġu evitati generazzjoni ta' tahlita ta' particelli fl-arja waqt il-proċess ta' estrazzjoni. Kun ċert li jintużaw xwabel ta' l-apparat li jomoġenizza sterilizzati għal kull kampjun. Jekk it-test tal-PCR għandu jkun evitat, aħseb sabiex tevita li jkun hemm kontaminazzjoni ta' DNA minn kampjuni oħra fil-kontenituri jew apparat li jintuza biex issir it-tahna. It-tahna f'borż li jistgħu jintremew u l-użu ta' tubi li jintremew wara l-użu huma kollha rrakkomandati fejn jintuza l-PCR.

- 1.1.3. Ferra l-likwidu li jibqa' wara. Jekk jidher eċċessivament imniġġes, iċċarah jew permezz ta' ċentrifugazzjoni lenta (mhux iktar minn 180 g għal għaxar minuti f'temperatura ta' 4-10 °C) jew permezz ta' filtrazzjoni fi vakwu (40-100 µm), il-filtri jinħaslu dejjem b'iktar (10 ml) kimika li żżomm il-kundizzjonijiet kimiċi stabbli. (*buffer*)

- 1.1.4. Ikkoncentra l-parti batterika permezz ta' ċentrifugazzjoni bi velocità 7 000g għal hmistax il-minuta (jew 10 000 għal 10 minuti) f'temperatura ta' bejn 4-10 °C u armi l-likwidu residwu mingħajr ma tharbat ir-residwu (*pellet*).

- 1.1.5. Qiegħed ir-residwu fi 1.5ml ta' kimika apposta li żżomm il-kundizzjonijiet kimiċi stabbli (*buffer*) (Appendiċi 4). Uża 500 µl biex tittestja għal *R. solanacearum*, 500 µl għal *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus* u 500 µl għal raġunijiet ta' referenza. Żid glicerol sterilizzat sal-konċentrazzjoni finali ta' 10-25 % (v/v) mal 500 µl ta' l-alikwot ta' referenza u lill-alikwot li jifdal tat-test, hawwad u erfa' fi -16 to -24 °C (ġimgħat) jew fi -68 sa -86 °C (xhur). Ippreżerva l-alikwoti tat-test taħt temperatura ta' 4-10 °C waqt it-testing.

Mhux affidabli li jsir iffriżar jew jinħallu ripetutament.

Jekk hemm il-htieġa ta' trasport għall-estratt, kun cert li jsir f'kontenitur li jżomm il-keśha fi żmien ta' 24 sa 48 siegħa.

- 1.1.6. Huwa imperattiv li kull kontroll pożittiv u kampjuni għall-*R. solanacearum* jiġu meqjusa separatament sabiex jiġi evitat il-kontaminazzjoni. Dan japplika fi pjastru ta' l-IF u għat-testijiet kollha.

1.2. Testijiet

Ara l-illustrazzjoni u deskrizzjoni tat-testijiet u protokollu ottimizzati fl-appendiċi relevanti:

Izolazzjoni selettiva (ara Taqsima VI.A.4.)

Test IF (ara Taqsima VI.A.5.)

Testijiet PCR (ara Taqsima VI.A.6)

Test FISH (ara Taqsima VI.A.7)

Testijiet ELISA (ara Taqsima VI.A.8)

Il-Bioassay (Ara Taqsima VI.A.9.)

2. Metodi dettaljati għall-għarfien u identifikazzjoni ta' *R. solanacearum* f'kampjuni ta' tuberji ta' patata, tadam u pjanti oħra ta' provenjenza li ma jurux sintomi

2.1. Preparazzjoni tal-kampjun

Nota: Għall-kampjuni ta' popolazzjonijiet ta' *R. solanacearum* huwa indikat li wiehed jittestja kampjuni komposti. Il-proċedura tista' tiġi applikata faċilment għal kampjuni komposti minn ammont ta' 200 parti ta' zokk. Fejn isiru studji dawn irridu jsiru fuq kampjun repreżentattiv statistikalment tal-popolazzjoni ta' pjanti li qed tkun investigata.

2.1.1. Iġbor 1-2 cm biċċiet taz-zkuk f'kontenitur sterillizzat skond dawn il-proċeduri ta' ġbir ta' kampjuni li ġejjin:

Pjanti tat-tadam żgħar: B'sikkina nadifa u disinfezzjata, aqta' biċċa fiha ċentimetru wiehed mill-bażi ta' kull zokk, f'it iktar il-fuq mill-livell tal-hamrija.

Pjanti tat-tadam ta' l-ġheliq jew tas-serrer: B'sikkina nadifa u disinfezzjata, aqta' il-fergħa l-iktar baxxa minn kull pjanta billi taqta' f'it iktar il-fuq mill-ġonta ta' bejn iz-zokk pċipali. Aqta' biċċa ta' ċentimetru wiehed minn-naha ta' isfel minn kull fergħa.

Pjanti ospitanti oħrajn: B'sikkina nadifa u disinfezzjata jew b'imqass taż-żabra, aqta' bicca fiha ċentimetru wiehed mill-bażi ta' kull zokk, f'it iktar il-fuq mill-livell tal-hamrija. Fil-każ ta' *S. dulcamara* jew pjanti oħra ta' provenjenza li jikbru fl-ilma, nehhi biċċiet ta' 1-2 cm miz-zkuk ta' taht l-ilma jew mill-fergħa orizzontali b'għerq akkwatiċi.

Meta jsir ġbir ta' kampjuni minn post partikolari huwa indikabbli li jsir testjar fuq kampjun statistikament repreżentattiv għal mhux inqas minn 10 pjanti għal kull punt ta' kampjunar ta' kull haxixa li hija potenzjalment ta' provenjenza. L-investigazzjoni ta' l-organizmu patoġeniku jkun iktar lajn tmiem ir-rebbiegħa, fis-sajf u fil-harifa, għalkemm infezzjonijiet naturali jistgħu jinstabu tul is-sena kollha fis-*Solanum dulcamara* perenni li tikber fil-korsijiet ta' l-ilma. Pjanti li fuqhom jistgħu jikbru huma pjanti ta' patata voluntiera *Solanum dulcamara*, *S. nigrum*, *Datura stramonium* u membri oħra tal-familja Solanaceae. Pjanti oħra li jistgħu jservu ta' mezz għall-ġhixien huma *Portulaca oleracea*. Ċertu speċi ta' hxejjex Ewropew li jistgħu potenzjalment iżommu popolazzjonijiet ta' *R. solanacearum* biovar 2/Razza 3 f'għerq u/jew riżosferi f'kundizzjonijiet ambjentali speċifiċi jinkludu *Atriplex hastata*, *Bidens pilosa*, *Cerastium glomeratum*, *Chenopodium album*, *Eupatorium cannabinum*, *Galinsoga parviflora*, *Ranunculus scleratus*, *Rorippa* spp., *Rumex* spp., *Silene alba*, *S. nutans*, *Tussilago farfara* u *Urtica dioica*.

Nota: Eżaminazzjoni viżwali għal sintomi interni (tiġrif vaskulari jew nixxa batterika) tista' ssir f'dan l-istadju. Ifred segmenti taz-zokk bis-sintomi u ttestja separatament (Ara Taqsima II).

2.1.2. Iddisinfetta s-segmenti taz-zkuk permezz ta' l-etanol 70 % u mill-ewwel nixxef permezz ta' karta assorbenti Imbagħad ipproċessa s-segmenti taz-zkuk permezz ta' wahda mill-proċeduri li ġejjin:

(a) Poġġi s-segmenti f'ammont (approssimativament 40ml) suffiċjenti ta' kimika li żżomm il-kundizzjonijiet kimiċi stabbli waqt l-estrazzjoni (*extraction buffer*) (Appendiċi 4) u hawwad permezz ta' apparat rotatorju (50-100rpm) għal erba' sigħat f'temperatura inqas minn 24 °C jew 16 – 24 siegħa f'refrigerazzjoni. jew

(b) Ipproċessa mill-ewwel, billi ttahhan is-segmenti f'borża tat-tithin ħoxna (eż Stomacher jew Bioreba) bi volum approprjat ta' buffer għall-estrazzjoni (appendiċi 4) permezz ta' mazza tal-lasktu jew tagħmir apposta (eż Homex). Jekk dan mhux disponibbli, erfa' is-segmenti taz-zkuk għal-mhux iktar minn 72 siegħa jew għal mhux iktar minn 24 siegħa f'temperatura ambjentali.

2.1.3. Ferra l-likwidu li jifdal wara li jkun qagħad għal 15 il-minuta.

2.1.4. Iktar kjarifikazzjoni dwar l-estrazzjoni u konċentrazzjoni tal-parti batterika mhumiex dejjem neċessarji iżda jistgħu jsiru billi ssir filtrazzjoni u/jew ċentrifugazzjoni kif imfassal f'Taqsima III.1.3 – 1.1.5.

2.1.5. Aqsam fi tnejn il-kampjun pur jew ikkoncentrat f'zewġ partijiet indaqs. Poggji nofs f'4-10 C waqt it-test u erfa' il-parti l-oħra b'10-25 % (v/v) glicerol sterilizzat fi - 16 to - 24 °C (gimghat) jew fi - 68 to - 86 C (gimghat) jekk ikun hemm mil-htieġa ta' iktar testijiet.

2.2. Testijiet

Ara l-illustrazzjoni u deskrizzjoni tat-testijiet u protokollu ottimizzati fl-appendiċi rilevanti:

Izolazzjoni selettiva (ara Taqsima VI.A.4.)

Test IF (ara Taqsima VI.A.5)

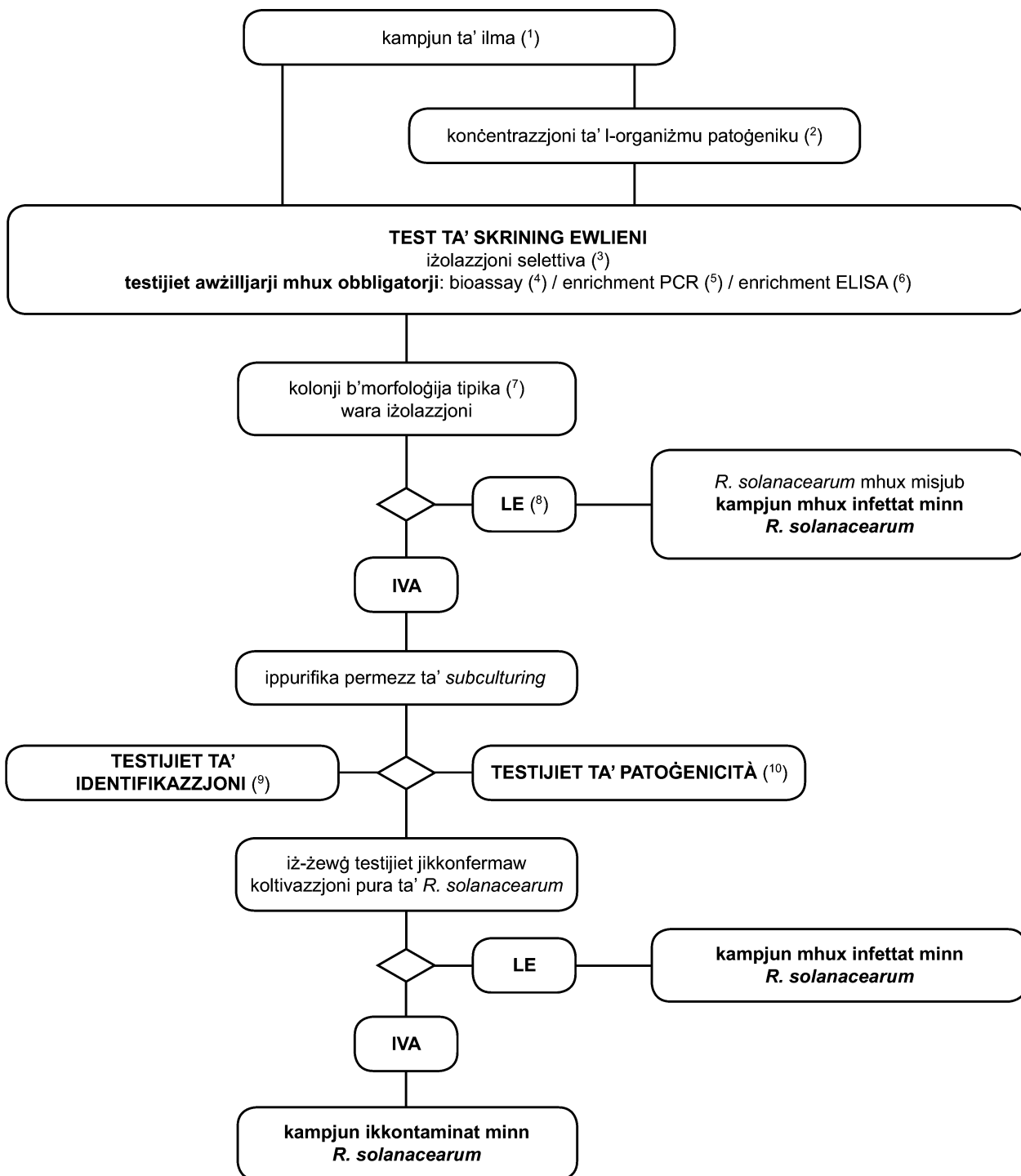
Testijiet PCR (ara Taqsima VI.A.6)

Test FISH (ara Taqsima VI.A.7)

Testijiet ELISA (ara Taqsima VI.A.8)

Il-Bioassay (Ara Taqsima VI.A.9.)

TAQSIMA IV

1. Skema għall-gharfien u identifikazzjoni ta' *R. solanacearum* fl-ilma

- (¹) Ara Taqsima IV.2.1.għall-proċeduri ta' kampjunar irrikmandati.
- (²) Konċentrazzjoni ta' l-organiżmi patoġeniċi huma deskritti fit-Taqsima IV.2.1. Il-konċentrazzjoni żżid il-popolazzjonijiet taż-żewġ organiżmi patoġeniċi u l-batterji saprofitiċi u huwa rrakkomandat biss jekk ma jirriżultax fl-inhibizzjoni tat-test ta' izolazzjoni.
- (³) It-test ta' izolazzjoni selettiva huwa mfassal f' Taqsima VI.A.4.
- (⁴) It-test tal-*bioassay* huwa mfassal f' Taqsima VI.A.9.
- (⁵) Metodi ta' *PCR* li jinkorporaw materjali li jissostanzjaw l-għixien ta' l-organiżmu huma mfassla fi Taqsima VI.A.4.2 u f' Taqsima VI.A.6.
- (⁶) Metodi ta' *ELISA* li jinkorporaw materjali li jissostanzjaw l-għixien ta' l-organiżmu huma mfassla fi Taqsima VI.A.4.2 u f' Taqsima VI.A.8.
- (⁷) Morfolgija tipika tal-kolonja hija mfassla f' Taqsima II.3.d.
- (⁸) Proċeduri ta' trobbija jistgħu ma jirnexxux minhabba kompetizzjoni jew inhibizzjoni minn batterji saprofitiċi. Jekk huma sospettati popolazzjonijiet kbar saprofitiċi li jaffetwaw l-izolazzjoni, irrepeti l-izolazzjoni wara d-dilwizzjoni tal-kampjun fl-ilma sterilizzat.
- (⁹) Identifikazzjoni korretta ta' gruppi safja ta' organiżmi izolati preżunti *R.solanacearum* tinkiseb permezz tat-testijiet imfassla f' Taqsima VI.B.
- (¹⁰) It-test ta' patoġeniċità huwa mfassal f' Taqsima VI.C.

2. Skema għall-għarfien u identifikazzjoni ta' *R. solanacearum* fl-ilma.

Prinċipju:

L-iskema validata ta' għarfien, imfassla f'din it-taqsim, hija applikabli għall-għarfien ta' organiżmu patoġeniku f'kampjuni ta' ilma tal-wiċċ u jista' jkun applikat ukoll għat-testing ta' kampjuni ta' materjal ipproċessat mill-patata jew derivati mid-dranagġ. Izda, huwa importanti li jingharaf li s-sensittività tal-metodu ta' għarfien iwarja skond il-materjal li qiegħed isir fuqu t-test. Is-sensittività tat-test ta' iżolazzjoni huwa affetwat minn popolazzjonijiet ta' batterji saprofitiċi kompetituri li ssoltu huwa oġġa f'materjal meħud minn proċessar ta' patata u minn effluwent ta' dranaġġ milli minn sors ta' ilma tal-wiċċ. Fejn l-iskema mfassla hija mistennija li wieħed ikun jista' jagħraf sa fit daqs 10^3 cellula per litru minn ilma tal-wiċċ, is-sensittività minn materjal meħud minn proċessar ta' patata jew effluwent ta' dranaġġ huwa probabli li tkun iktar baxxa. Għal din ir-raġuni huwa indikat li jiġu ttestjati sostanzi effluwenti wara kull proċedura ta' purifikazzjoni (eż sedimentazzjoni jew filtrazzjoni) li jservu sabiex jitnaqsu l-popolazzjonijiet ta' batterji saprofitiċi. Il-limitazzjonijiet fis-sensittività ta' l-iskema ta' testijiet trid tiġi kkunsidrata meta l-akkuratezza ta' riżultati negattivi miksuba tkun assessjata. Minkejja li din l-iskema ġiet użata b'suċċess f'xogħol ta' investigazzjoni biex tiġi vverifikata l-preżenza jew le ta' l-organiżmu patoġeniku f'ilma tal-wiċċ, il-limitazzjonijiet tagħha jridu jiġu kkunsidrati meta użati f'investigazzjonijiet simili ta' materjal minn proċessar ta' patata jew effluwent ta' dranaġġ.

2.1. Preparazzjoni tal-kampjun

Nota:

- Għarfien ta' *R. solanacearum* f'ilma tal-wiċċ hija l-iktar akkurata fl-aħħar tar-rebbiegħa, Fis-sajf u fil-harifa meta t-temperatura ta' l-ilma taqbeż il-15 °C.
- Proċeduri ta' għbir ta' kampjuni rrepetuti fiż-żminijiet imsemmija f'postijiet assenjati jzidu l-akkuratezza tal-metodu ta' għarfien billi jitnaqsu elementi ta' varjazzjoni klimatiċi.
- Wieħed għandu jikkunsidra l-effetti ta' xita qawwija jew tal-Ġeografija tal-kors ta' l-ilma sabiex jiġu evitati effetti dilwenti estensivi li jstgħu jgħidu l-preżenza patoġenika.
- Għandhom jittiehdu kampjuni mill-wiċċ hdejn il-pjanti ta' provenjenza jekk dawn huma preżenti.

2.1.1. F'postijiet ta' kampjunar magħżula, iġbor kampjuni ta' ilma billi jintlew tubi li jstgħu jintremaw wara u li huma sterilizzati minn fond ta' iktar minn 30 cm u mhux iktar il-barra minn 2 m mit-tarf. Sabiex jiġu pproċessati l-effluwenti ta' dranaġġ, iġbor il-kampjuni mill-punt ta' skariku ta' l-effluwent. Qisien tal-kampjuni ta' mhux iktar minn 500ml għal kull post ta' kampjunar huma indikati. Jekk wieħed jippreferi kampjuni iżgħar, huwa rrakkmandat li jittiehdu kampjuni għal mill inqas tliet okkażjonijiet għal kull punt ta' kampjunar, fejn kull kampjun jikkonsisti minn zewġ sub kampjuni replikati ta' mill-inqas 30 ml. Għal xogħol ta' stharrig intensiv, aghżel mill inqas tliet punti ta' kampjunar għal kull kilometru ta' kors ta' l-ilma u aċċerta li l-fergħat li jiżbokkaw fil-kors huma kkampjunati wkoll.

2.1.2. Trasport ta' kampjuni jrid isir taht kundizzjonijiet mudlama (4-10 °C) u ttestja qabel ma' jgħaddu 24 siegħa.

2.1.3. Jekk hu meħtieġ, il-parti batterika tista' tiġi kkonċentrata permezz ta' wieħed minn dawn il-metodi li ġejjin:

- (a) Iċċentrifuga 30-50 ml sub-kampjuni veloċità ta' 10 000 g għal 10 minuti (7,000 g għal 15 il-minuta) preferibbilment f'4-10 °C, armi l-likwidu li jibqa' u žid 1ml tal-kimika li żżomm kundizzjonijiet stabbli (*buffer*) mar-residwu (Appendiċi 4).
- (b) Iffiltra permezz ta' passatur (*membrane filter*) magħmul minn pori ta' daqs minimu ta' 0.45 µm jippreċedi l-ħasil tal-filtru fi 5-10ml kimika stabilizzanti (*pellet buffer*) u jinżamm il-materjal maħsul. Dan il-metodu huwa indikat għal volum ikbar ta' ilma li fih ammonti iżgħar ta' organiżmi saprofitiċi.

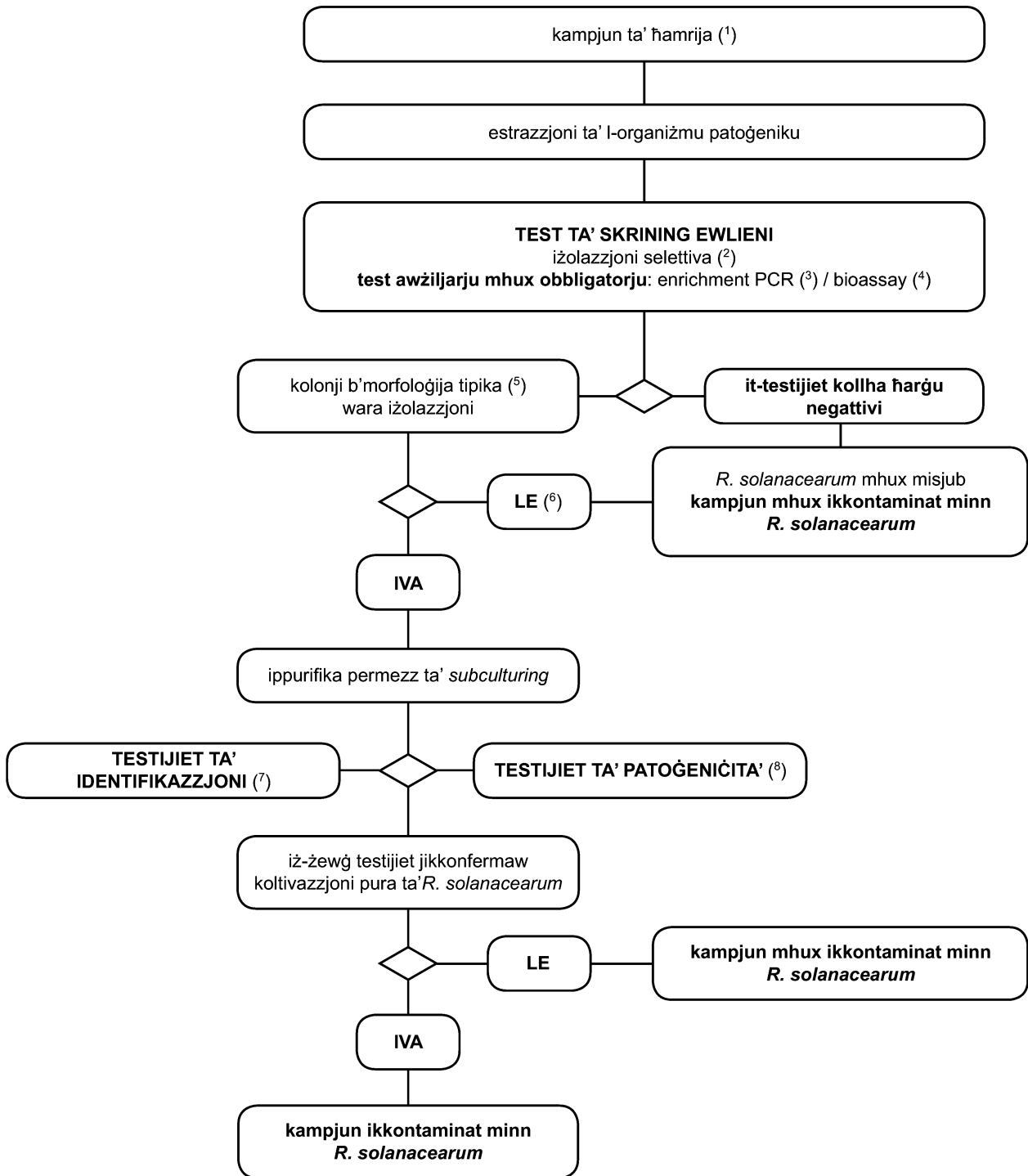
Metodu ta' kkonċentrament mhux indikat għal kampjuni ta' materjal meħud minn proċessar ta' patata jew effluwenti ta' dranaġġ għaliex popolazzjonijiet ippropagati ta' batterji saprofitiċi huma ta' tfixkil totali għall-għarfien ta' *Ralstonia solanacearum*.

2.2. Testijiet

Ara l-illustrazzjoni u deskrizzjoni tat-testijiet u protokollu ottimizzati fl-appendiċi rilevanti:

TAQSIMA V

1. Skema għall-gharfien u identifikazzjoni ta' *R. solanacearum* fil-hamrija



- (¹) Ara Taqsima V.2.1.għall-proċeduri ta' kampjunar irrikkmandati.
- (²) It-test ta' iżolazzjoni selettiva huwa mfassal f' Taqsima VI.A.4.
- (³) Metodi ta' *PCR* li jinkorporaw materjali li jissostanzjaw l-għixien ta' l-organiżmu huma mfassla fi Taqsima VI.A.4.2 u f' Taqsima VI.A.6.
- (⁴) It-test tal-*bioassay* huwa mfassal f' Taqsima VI.A.9.
- (⁵) Morfolġija tipika tal-kolonja hija mfassla f' Taqsima II.3.d.
- (⁶) Proċeduri ta' trobbija jstgħu ma jirnexxux minhabba kompetizzjoni jew inhibizzjoni minn batterji saprofitiċi. Jekk huma sospettati popolazzjonijiet kbar saprofitiċi li jaffetwaw l-iżolazzjoni, irrepeti l-iżolazzjoni wara d-dilwizzjoni tal-kampjun fl-ilma sterilizzat.
- (⁷) Identifikazzjoni korretta ta' gruppi safja ta' organiżmi iżolati preżunti *R.solanacearum* tinkiseb permezz tat-testijiet imfassla f' Taqsima VI.B.
- (⁸) It-test ta' patoġeniċità huwa mfassal f' Taqsima VI.C.

2. Skema għall-għarfien u identifikazzjoni ta' *R. solanacearum* fil-hamrija

Prinċipji

L-iskema validata ta' għarfien, imfassla f'din it-taqsim, hija applikabli għat-tagħrif ta' organiżmi patoġeniċi minn kampjuni ta' hamrija iżda tista' tintuża wkoll għat-testjar ta' skart solidu minn proċessar ta' patata jew minn effluwent imtajjen ta' dranaġġ. Iżda jrid jiġi kkonsidrat li tali metodi huma ta' akkuratizza insuffiċjenti għal fini ta' garanzija għall-għarfien ta' popolazzjonijiet baxxi jew/u popolazzjonijiet imfirxa ta' *Ralstonia solanacearum* li jistgħu jinstabu f'kampjuni infestati b'mod naturali fi kampjuni ta' dawn is-sustrati.

Il-limitazzjonijiet fl-akkuratezza ta' din l-iskema ta' testijiet iridu jittiehdu in konsiderazzjoni meta l-akkeratezza ta' tali testijiet negattivi jinkisbu kif ukoll meta użati f'investigazzjonijiet li l-għan tagħhom huwa li jstabilixxu l-preżenza jew nuqqas ta' l-organiżmu patoġeniku fi hamrija jew effluwenti mtajna. L-aktar test akkurat għall-preżenza ta' l-organiżmu patoġeniku fi hamrija ta' l-għelieqi huwa li jithawlu pjanti suxxettibli u jsir monitoraġġ għall-preżenza ta' infezzjoni, iżda b'dan il-metodu wkoll livelli baxxi ta' kontaminazzjoni mhumiex perċepibbli.

2.1. Preparazzjoni tal-kampjun

2.1.1. Ġbir ta' kampjuni ta' hamrija ta' l-għelieqi għandu jsegwi prinċipji ta' kampjunar li japplika għall-organiżmi nematodi. Iġbor 0.5-1 kg ta' hamrija għal kull kampjun minn 60 firxa ta' art per 0.3 ettaru minn fond ta' 10-20 ċm (jew permezz ta' kwadru ta' 7 × 7 metru) Jekk huwa ssospettat il-preżenza ta' l-organiżmu patoġeniku, žid in-numru ta' żoni ta' ġbir sa 120 per 0.3 ettaru. Żomm il-kampjuni f'temperatura ta' 12-15 °C qabel it-testjar. Iġbor kampjuni mehudin minn materjal ta' pproċessar ta' patata u minn effluwenti mtajna ta' dranaġġ billi tiġbor kilogram wiehed minn firxiet ta' art li huma rappreżentattivi għall-volum totali ta' effluwent li qiegħed jiġi ttestjat. Hallat kull kampjun sew qabel it-testijiet.

2.1.2. Hawwad sub-kampjuni ta' 10–25 gm ta' hamrija jew effluwent permezz ta' apparat rotatorju (250 rpm) fi 60-150 ml sustanza li żżomm kundizzjonijiet kimiċi stabbli għall-estrazzjoni (*buffer*) (Appendiċi 4) għal żmien sa sagħtejn. Jekk meħtieġ iż-żieda ta' 0.02 % Tween-20 sterilizzat u 10-20 g ta' żrar sterilizzat jistgħu jgħinu fid-dispersjoni.

2.1.3. Żomm it-taħlita ta' likwidu u solidi f'4 °C waqt it-test.

2.2. Testijiet

Ara l-illustrazzjoni u deskrizzjoni tat-testijiet u protokollu ottimizzati fl-appendiċi rilevanti:

TAQSIMA VI

PROTOKOLL OTTIMIZZAT GĦALL-GĦARFIEN U IDENTIFIKAZZJONI TA' *R. SOLANACEARUM*

A. TESTIJET TA' DIJANJOSI U GĦARFIEN

1. testijiet ta' separar u analiż taz-zkuk

Il-preżenza ta' *R. solanacearum* fi zkuk ta' patata li qed tidbiel, tadam jew pjanti oħra jistgħu jiġu indikati permezz ta' testijiet prezuntivi li ġejjin: Aqta' z-zokk f'it 'il fuq mil-livell tal-hamrija. Dahhal il-faxxa maqtugħa fi tubu ta' ilma nadif. Osserva għall-preżenza ta' hruġ ta' sostanza batterika fi hjut provenjenti mit-tessuti vaskulari wara f'it minuti.

2. Tfittxija ta' qmuħ zghar ta' poly-β-hydroxybutyrate

1. Ċappas kampjun zghir ta' nixxa batterika minn tessut infettat jew minn kolonja ta' l-organiżmu mrob-bija in vitro għall 48 siegħa fuq sustanza tat-trobbija YPGA jew SPA (Appendiċi 2) fuq pjastra tal-mikroskopju.
2. Ipprepara kampjuni ta' *biovar* 2 varjazzjoni ta' *R. solanacearum* bhala control pożittiv u jekk ikkusidrat ta' użu, kontroll negattiv ta' speci ta' organiżmu li huwa ċert li jagħti riżultat negattiv.
3. Halli joqgħod f'it għall-arja, nixxef u webbes il-kampjun permezz ta' shana ta' fjamma.
4. Tebba' il-prepart bi *Nile Blue* jew *Sudan Black* u osserva mikroskopikament kif imfassal:

Test ta' Nile Blue:

- (a) Xarrab kull pjastra bi soluzzjoni ta' 1 % ta' Ikħal Nile A u inkuba kollox għal għaxar minuti f'55 °C.
- (b) Nehhi l-materjal koloranti żejjed. Aħsel bi ftit ilma tal-vit. Nehhi ilma żejjed permezz ta' karti assorbenti.
- (c) Xarrab il-kampjun bi aċċu aċetiku 8 % u inkuba kollox għal minuta f'temperatura ambjentali
- (d) Aħsel bi ftit ilma tal-vit. Nehhi ilma żejjed permezz ta' karti assorbenti.
- (e) Erga xarrab ftit b'qatra ilma u għatti bi pjastra zgħira rqieqa.
- (f) Eżamina t-tidlika li għet imtebbgħa taħt mikroskopju epifluworexxenti ta' 450 nm taħt immersjoni fiż-żejt, bi manjifikazzjoni ta' 600-1 000 permezz ta' oġġettiv f'immersjoni taż-żejt u l-ilma.
- (g) Osserva wkoll taħt emissjoni ta' dawl normali sabiex taċċerta li l-qmuħ huma intraċellulari u l-għamla taċċelluli hija tipikament ta' *R. solanacearum*.

Test bis-Sudan Black:

- (a) Xarrab kull pjastra (*slide*) bi soluzzjoni ta' 0.3 % ta' Sudan Iswed B fi soluzjoni ta' 70 % etanol u inkuba għal 10 minuti fi temperatura ambjent.
- (b) Nehhi l-materjal koloranti żejjed.
- (c) Bill il-pjastri brevement f'soluzzjoni ta' xylol u nixxef fuq karta ossorbenti. *Attenzjoni: Il-Xylol huwa ta' periklu, prekawzjonijiet meħtieġa jridu jittieħdu u aħdem fi vetrina li hi mgħammra b'ventilatur għall-estrazzjoni.*
- (d) Xarrab il-pjastri permezz ta' % (w/v) safranin akweuu, u halli għal għaxar minuti fi temperatura ambjentali. *Attenzjoni: Is-safranin huwa ta' periklu, prekawzjonijiet meħtieġa jridu jittieħdu u aħdem fi vetrina li hi mgħammra b'ventilatur għall-estrazzjoni.*
- (e) Aħsel taħt ilma tal-vit nieżel bil-mod, nixxef b'karti assorbenti u poġġi pjastra zgħira fuqha.
- (f) Eżamina l-kampjuni kkolorati permezz ta' mikroskopju normali tad-dawl bi emissjoni ta' dawl taħt immersjoni fiż-żejt b'qawwa ta' magnifikazzjoni ta' 1 000 permezz ta' oġġettiv apposta.
- (g) Fittex it-tbajja blu jew suwed ta' qmuħ ta' *PHB* f'ċelluli ta' *R. solanacearum* bil-qxur taċċelluli lewn roża.

3. Testijiet ta' tagħqid seroloġiku (Agglutination)

Tagħqid ta' ċelluli ta' *R. solanacearum* fi nixxa batterika jew estratti minn tessuti sintomatiċi jiġi osservat permezz ta' antikorpi validati (ara Appendiċi 3) mmarkat bil-markaturi, kkuluriti approprijatament bħal ċelluli ta' *Staphylococcus aureus* ħomor jew partiċelli tal-lattiċi. Jekk qed jintużaw settijiet li jistgħu jinkisbu kommerċjalment, segwi l-istruzzjonijiet tal-manufattur. Jekk le, segwi dawn il-proċeduri:

- (a) Hallat qattra tas sospensjoni ta' antikorpi mmarkati u nixxa batterika (approssivament 5 µl kull wiehed) fuq il-wiċċ ta' pjastri b'hafna hofriet.
- (b) Ipprepara kontrolli negattivi u pożittivi bi sospensjoni ta' *R. solanacearum biovar 2* u varjetà eterologa.
- (c) Osserva għal tagħqid fi kampjuni pożittivi wara li jithaltu bil-mod għal 15 -il sekonda.

4. Iżolazzjoni selettiva

4.1. Pjastra selettiva

Nota: Qabel ma jintuża dan il-metodu għall-ewwel darba, aghmel testijiet preliminari sabiex tassicura għarfien riproducibbli ta' 10^3 sa 10^4 ta' unitajiet li jiffurmaw kolonji ta' *R. solanacearum* għal kull ml miżjud ma' l-estratti mill-kampjuni li ttestjaw negattivi qabel.

Uża medji selettivi validati approprijatament bħalma huma SMSA (kif immodifikat minn Elphinstone et al., 1996; ara Appendiċi 2).

Attenzjoni trid tingħata sabiex ikun hemm differenzjazzjoni bejn *R. solanacearum* u batterji oħra kapaci jiffurmaw kolonji fuq tali sostanza għat-trobbija. Il-kolonji jistgħu saħansitra jkollhom morfologija atipika jekk il-pjastri huma Iffollati bil kolonji ta' *R. solanacearum* jew jekk batterji antagonistiċi huma preżenti wkoll. Fejn hemm sospett ta' kompetizzjoni jew antagoniżmu, il-kampjun irid jiġi eżaminat permezz ta' test iehor

L-oghla akkuratezza ta' dan il-metodu jista' jinkiseb meta l-kampjuni użati huma friski. Dan il-metodu jista' jiġi applikat ukoll fuq estratti li ġew miżmuma taħt il-glicerol fi – 68 sa – 86 °C.

Bħala kontrolli pożittivi, ipprepara dilwizzjonijiet deċimali minn sospensjoni ta' 10^6 għal kull varjetà bijovar 2 aggressiva ta' *R. solanacearum* (e.ż. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857). Sabiex tevita kwalunkwe tip ta' kontaminazzjoni, ipprepara kontrolli pożittivi separatament mill-kampjuni li jridu jiġu ttestjati.

Għal kull numru ta' medju selettiv ippreparat ġdid il-konvenjenza tiegħu għat-*tkabbir tal-patoġenu* għandu jiġi ttestjat qabel ma jintuża sabiex jiġu ttestjati kampjuni ta' rutina.

Materjal ta' kontroll tat-test f'mod identiku bħall-kampjun(i).

4.1.1. Aghmel teknika ta' kisi b'dilwizzjoni approprijata sabiex wiehed jaċċerta li kull kolonja saprofitika li tista' tikber huma maħsulini il-barra. Ifrex 50 - 100 μ l għal kull pjastra ta' estratt mill-kampjun minn kull dilwizzjoni.

4.1.2. Inkuba l-pjastri fi 28 °C. Aqra r-riżultat tal-pjastra wara 48 siegħa u għal kuljum wara għal sitt ijiem. Kolonji tipici ta' *R. solanacearum* fuq materja SMSA huma bojod ċari konsistenza tal-halib, ċatti, irregolari u fluwidi u wara 3 ijiem inkubazzjoni juru kolorazzjoni roża sa aħmar kulur id-demem b'linji jew crieke interni. (ara l-portal <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>)

Nota: Kolonji atipici ta' *R. solanacearum* jistgħu jiffurmaw fuq tali sostanza. Dawn jistgħu jkunu żgħar, tondi, kompletament homor u kostitwenza mhux fluwida jew parzjalment fluwida u għalhekk diffiċli sabiex wiehed jagħmel distinzjoni minn kolonji saprofitici ta' batterji.

4.1.3. Ohroġ kolonji safja ta' *R. solanacearum* wara tqegħid jew kiswa b'metodi ta' dilwizzjoni fuq sostanza ta' trobbija (medju) ġenerali, sabiex jinkisbu kolonji iżolati. (ara Appendiċi 2).

4.1.4. Erfa' il-kolonji għal żmien qasir f'ilma sterilizzat (pH 6-8, hieles mill-kloru) fid-dlam, jew għal żmien twil f'sostanza protettiva għaċ-ċelluli fi – 68 to – 86 °C jew lijofilizzat..

4.1.5. Identifika kolonji preżunti (ara Taqsima VI.B.) u aghmel test ta' patoġenicità.

Interpretazzjoni tar-riżultati miksuba mill-kiswa selettiva

It-test ta' kiswa selettiva jgħid negattiv jekk ebda kolonja batterika tkun viżibbli wara 6 ijiem jew jekk ebda kolonja preżunta, tipika tal-*R. solanacearum* tinstab, dejjem jekk ebda tfixkil huwa ssospettat minhabba kompetizzjoni jew antagoniżmu minn batterji oħra u li kolonji tipici ta' *R. solanacearum* jinstabu fil-kontrolli pożittivi.

Il-metodu ta' kisi selettiv jgħid pożittiv jekk kolonji preżunti ta' *R. solanacearum* huma ssospettati.

4.2. Proċedura ta' trobbija f'ambjent favorevoli

Uża sostanza għat-trobbija favorevoli li kun invalidata bħal brodu mmodifikat ta' Wilbrink (Ara Appendiċi 2).

Din il-proċedura tista' tintuża sabiex jiżiedu selettivament il-popolazzjonijiet ta' *R. solanacearum* minn estratti ta' kampjuni u tiżied l-akkuratezza tal-metodu. Il-proċedura tiddilwixxi inibituri tar-reazzjoni PCR (1:100). Għandu jittiehed in konsiderazzjoni li trobbija f'ambjent favorevoli ta' *R. solanacearum* jista' ma jirnexxi minhabba kompetizzjoni jew antagoniżmu minn organiżmi saprofitici li huma ta' spiss benefiċjarji tal-kundizzjonijiet. Għal din ir-raġuni, iżolazzjoni ta' *R. solanacearum* minn sostanzi li jinkoraġġixxu t-tkattir tal-kolonji jistgħu jkunu diffiċli. Ulterjument, filwaqt li popolazzjonijiet ta' organiżmi saprofitici relatati seroloġikament jistgħu jiżiedu, l-użu ta' antikorpi monoklonali, speċifiċi hliet antikorpi poliklonali huwa indikat meta ser isir it-test ELISA.

- 4.2.1. Għat-teknika ta' PCR f'sustanzi ta' faċilitazzjoni għat-trobbija, trasferiment ta' kamjun mill-estratt ta' 100 µl fi 10 ml ta' brodu ta' sustanzi siewja għat-trobbija (Appendiċi 2) alikwotata minn qabel ftubi jew reċipjenti li huma safja mid-DNA. Fit-teknika ELISA jistgħu jintużaw ammonti oghla ta' estratt mill-kampjun mqabbel mal-brodu (eż 100 µl fi 1.0 ml ta' brodu).
- 4.2.2. Inkuba għal 72 siegħa f'temperatura ta' 27 sa 30 °C f'sistema ta' trobbija statika jew dinamika movimentata u bl-ghotjien mhux issikkati sabiex issir arjazzjoni.
- 4.2.3. Hawwad sew qabel ma jintuża fit-testijiet ELISA jew PCR.
- 4.2.4. Agħti l-istess trattament fil-brodu ssostanzjat bħal fil-kampjun(i) fit-testijiet hawn fuq.

Nota: Jekk tfixkil fit-trobbija ta' *R. solanacearum* permezz ta' brodu ssostanzjat jiġi antiċipat, minhabba popolazzjonijiet għolja ta' ċerti batterji saprofitiċi, ssostanzjar ta' kampjun ta' l-estratt qabel ma ssir iċ-ċentrifugazzjoni jew stadji oħra ta' koncentrament jistgħu jagħtu riżultati aħjar.

5. Testijiet IF

Prinċipju:

L-użu tat-test IF bħala test prinċipali ta' skrining huwa rrakmandat minhabba l-fatt li huwa ta' min joqgħod fuqu sabiex jinkisbu l-livelli meħtieġa.

Meta jintuża t-test ta' l-IF bħala metodu ta' skrining prinċipali, u r-riżultat johroġ pożittiv, l-izolazzjoni, PCR jew FISH jridu jitwettqu bħala test ta' skrining oħrajn. Meta t-test ta' l-IF jintuża bħala t-tieni test ta' skrining u r-riżultat ta' l-IF johroġ pożittiv, testijiet oħrajn skond l-iskema tal-proċeduri hija meħtieġa sabiex tkun kompluta l-analiżi.

Nota: Uża sors ta' antikorpi validati ta' *R. solanacearum* (ara l-portal <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Huwa rikmandat li *d-dożar* (titre) jiġi kkalkulat għal kull lott ta' antikorpi. *Id-dożar* jissejjah bħala l-ogħla fattur ta' dilwizzjoni fejn issir ir-reazzjoni ottimali meta tiġi ttestjata t-tahlita solida u likwida li fiha 10⁵ sa 10⁶ ċelluli per ml ta' varjetà omologa ta' *R. solanacearum* meta jintuża konjugat approprijat ta' 'fluorescein isothiocyanate' (FITC) skond ma' jirrikmanda l-manufattur. L-antisjeri validati poliklonali kollha kellhom titru IF ta' mill-inqas 1:2 000. Waqt it-test, l-antikorpi jridu jintużaw dilwiti f'dilwizzjoni(jiet) li toqrob-(joqorbu) jew li taqbel (jaqblu) eżattament mat-titru.

It-test irid isir fuq estratti minn kampjuni friski. Jekk tinhass il-ħtieġa, jista' jsir fuq kampjuni jew estratti miżmuma fi - 68 sa - 86 °C taht il-gliċerol. Il-gliċerol jista' jitneħħa mill-kampjun permezz ta' l-addizzjoni ta' ml wiehed ta' sustanza li żżomm il-kundizzjonijiet stabbli (Appendiċi 4), jsir mill-ġdid proċess ta' ċentrifugazzjoni għal 15-il minuta veloċità 7 000 g u jerġgħu jihaltu fi volume indaq ta' buffer. Dan huwa sikwit meħtieġ, speċjalment jekk il-kampjuni jiġu f'fissati mal-pjastra permezz tas-shana meta jinżammu fuq fjamma.

Ipprepara pjastru ta' kontrolli pożittivi separati tal-varjetà omologa jew xi varjetà oħra bħala referenza ta' *R. solanacearum*, imhalla l-estratt tal-patata, kif speċifikat f'Appendiċi 3 B u mhux obligatorjament fi buffer.

Tessut infettat naturalment (miżmum billi jkun lijoofilizzat jew iffriżat temperatura ta' - 16 to - 24 °C) jrid jintuża fejn hu possibli bħala kontroll simili fuq l-istess pjastra.

Bħala kontrolli negattivi, alikwoti ta' kampjuni ta' l-estratt li qabel harġu bħala testijiet negattivi għal *R. solanacearum* jistgħu jintużaw.

Materjali ta' kontroll standardizzati pożittivi u negattivi li jistgħu jintużaw ma' dan it-test huma mfassla fi Appendiċi 3.

Uża pjastru tal-mikroskopju li fihom hafna hofer preferibbilment għaxar aperturi ta' dijametru ta' sitt millimetri.

Materjal ta' kontroll tat-test f'mod identiku bħall-kampjun(i).

- 5.1. Ipprepara l-pjastru tat-test permezz ta' wiehed minn dawn il-proċeduri li ġejjin:

- (i) Għar-residwi (*pellet*) li għandhom relattivament kontenut żgħir ta' sedimentazzjoni ta' lamtu:

Qattar volum meqjus stàndard ta' dilwizzjoni (15 µl huwa xieraq għal 6mm dijametru ta' apertura - kabbar il-volum skond il-proporzjoni għal aperturi ikbar) ta' 1/100 tar-residwu ta' patata mħallat mill-ġdid, fl-ewwel apertura. Qattar volum simili ta' residwu mhux dilwit (1/1) fuq l-aperturi li jifdal fuq il-filliera. It-tieni filliera tista' tintuża bħala duplikata jew għall-użu ta' kampjun iehor kif ipprezentat fl-Illustrazzjoni 1.

(ii) Għar-residwu iehor:

Ipprepara dilwizzjonijiet deċimali (1/10, 1/100) tar-residwu risospiza fil-buffer apposta. Qattar volum stàndard (15 µl huwa xieraq għal 6mm dijametru ta' apertura – kabbar il-volum skond il-proporzjoni għal apertura ikbar) tar-residwu ta' patata mħallat (imħallat mill-ġdid) mill-ġdid (*suspended/resuspended pellet*) u kull dilwizzjoni fi filliera ta' aperturi. It-tieni filliera tista' tintuża bhala duplikata jew għall-użu ta' kampjun iehor kif ipprezentat fl-illustrazzjoni 2.

5.2. Nixxef il-qatriet f'temperatura ambjentali jew billi jissahhan sa temperaturi ta' 40 sa 45 °C. Iffissa ċ-ċelluli batteriċi mal-pjastra jew billi ssahhan (15 il-minuta f'temperatura ta' 60 °C), billi jinżammu fuq fjamma, permezz ta' l-etanol 95 % jew skond istruzzjonijiet specifici mill-fornitur ta' l-antikorpi.

Jekk tinhass il-htieġa, pjastri ffissati jistgħu jintrefgħu f'kontenitur apposta għat-tnixxif (*desiccated box*) għal żmien qasir kemm hemm b'żonn (l-iktar żmien ta' tlett xhur) qabel ma jsir ittestjar oħrajn.

5.3. Proċedura IF

(i) Skond il-preparazzjoni ta' pjastra tat-test fi 5.1 (i):

Ipprepara set ta' dilwizzjonijiet doppji. L-ewwel hofra jrid ikollha 1/2 id-dożar (T/2), l-oħrajn 1/4 tad-dożar (T/4), 1/2 tad-dożar (T/2), id-dożar (T) u d-doppju tad-dożar (2T).

(ii) Skond il-preparazzjoni ta' pjastra tat-test fi 5.1 (ii):

Ipprepara d-dilwizzjonijiet sabiex jinhadem it-test (WD) ta' l-antikorpi fil-buffer ta' l-IF. Id-dilwizzjoni li tintuża fit-tharriġ tat-test taffetwa l-ispeċifità.

Figura 1 Preparazzjoni tal-pjastra tat-test skond 5.1(i) u 5.3(i)

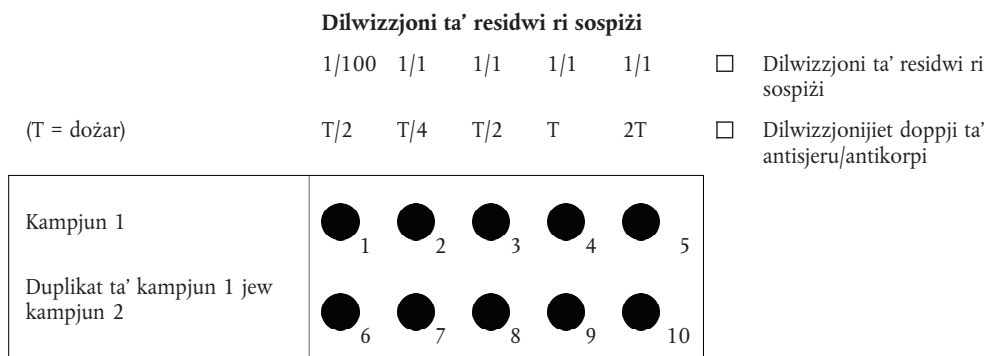
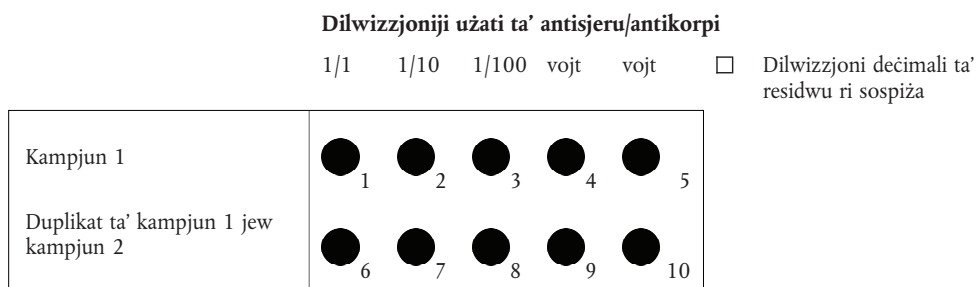


Figura 2 Preparazzjoni tal-pjastra tat-test skond 5.1(ii) u 5.3(ii)



- 5.3.1. Irranġa l-pjastru fuq karta assorbenti niedja. Għatti kull apertura ta' test kompletament permezz ta' dilwizzjoni-(jiet) ta' antikorpi. Il-volum ta' antikorpi fuq kull apertura jrid ikun mill-inqas il-volum ta' l-estratt applikat.

Il-proċedura li ġejja trid issir fl-assenza ta' istruzzjonijiet speċifiċi mill-fornituri ta' l-antikorpi.

- 5.3.2. Inkuba l-pjastru fuq karta umda taħt kopertura ta' 30 minuta ftemperatura ambjentali (18 – 25 °C).
- 5.3.3. Nehhi l-qatriet minn kull pjastra u laħħ bil-galbu f'buffer IF. Aħsel billi tagħddas għal 5 minuti fi buffer-Tween IF (Appendiċi 4) u wara f'buffer IF. Evita li tagħmel kontaminazzjoni permezz ta' arjusol jew qatriet żgħar. Nehhi bil-mod umdiċa eċċessiva permezz ta' karti assorbenti.
- 5.3.4. Irranġa l-pjastru fuq karta niedja. Agħtti l-apertura tat-test bid-dilwit ta' konjugat ta' FITC użat fid-sejba tad-dożar. Il-volum tal-konjugat applikat fuq din l-apertura trid tkun identika għall-volum ta' antikorpi użati.
- 5.3.5. Inkuba l-pjastru fuq karta umda taħt kopertura ta' 30 minuta ftemperatura ambjentali (18 – 25 °C).
- 5.3.6. Nehhi il-qtar ta' konjugat minn fuq il-pjastra billi ssir aġitazzjoni tal-pjastra. Laħħ u aħsel bħal qabel (5.3.3).

Nehhi bil-mod kull umidiċa eċċessiva.

- 5.3.7. Qattar 5-10 µl ta' 0.1M glicerol ibbufferjat bil-fosfat (Appendiċi 4) jew sostanza montanti li ma tiċċarax, li tinbiegħ kummerċjalment, fuq kull apertura applika pjastra żgħira sabiex tghatti.
- 5.4. Interpretazzjoni tat-test IF:

- 5.4.1. Eżamina l-pjastru taħt mikroskopju epifluworexxenti permezz ta' filtri xierqa għall-eċitament ta' l-FITC, taħt immersjoni fiż-żejt jew ilma manjifikazzjoni ta' 500-1 000. Osserva l-apertura billi thares ma' żewġ dijametri li huma perpendikulari ma' xulxin u mad-dawra perimetrika. Għal kampjuni li juru nuqqas jew fitit ċelluli osserva għall-inqas 40 aspekt mikroskopiku.

Ivverifika l-pjastra ta' kontroll pożittiva l-ewwel. Iċ-ċelluli jridu jkunu fluworexxenti u imtebbgħin kompletament fid-dożar ta' antikorpi immarkat jew fid-dilwizzjoni li tintuża għat-taħriġ tat-test. It-test IF (Ara Taq-sima VI.A.5.) irid isir mill-ġdid jekk issir abberrazzjoni tat-tebgha.

- 5.4.2. Osserva għall-preżenza ta' ċelluli jleqqu li għandhom morfologija karatteristika ta' *R. solanacearum* fl-apertura ta' testjar fuq il-pjastru. (ara portal <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). L-intesiċa fluworexxenti trid tkun ekwivalenti għal dik tal-varjeta' ta' kontroll pożittiva fl-istess dilwizzjoni. Ċelluli li huma mtebbgħin inkompletament jew bi fluworexxenza dgħajfa ma jridux jiġu meqjusa.

Jekk hemm suspett ta' kontaminazzjoni it-test irid jerga' jsir. Dan jista' jseħħ meta l-pjastru kollha minn lott juru ċelluli pożittivi minhabba kontaminazzjoni tal-buffer jew jekk ċelluli pożittivi jinstabu (il-barra mill-apertura) fuq il-kisja tal-pjastra.

- 5.4.3. Hemm bosta problemi relatati mat-test ta' l-immunofluworexxenza. Popolazzjonijiet oħra ta' ċelluli fluworexxenti b'morfologija atipika u batterji saprofitiċi reaġenti bi morfologija u dimensjoni simili għal *R. solanacearum* jistgħu jinstabu fil-qalba tan-naħa tal-għarqub u fi residwi meħudin minn segmenti taz-zkuk.
- 5.4.4. Ikkonsidra biss ċelluli fluworexxenti b'dimensjonijiet u morfologija tipika miksuba fid-dożar jew dilwizzjoni magħzula għat-test ta' antikorpi kif imfassal fi 5.3.

5.4.5. Interpretazzjoni tat-test ta' l-IF:

- (i) Jekk jinstabu ċelluli fluworexxenti bi morfologija karatteristika, hu stima tan-numru ta' ċelluli tipiċi per firxa mikroskopika u kkalkula n-numru ta' ċelluli tipiċi per ml ta' residwu imhallat mill-ġdid (Appendiċi 5).

It-test IF johroġ pożittiv għal kampjuni b'mhux inqas minn 5×10^3 ċelluli tipiċi per ml ta' residwu risospiz. Il-kampjun huwa kkonsidrat potenzjalment ikkontaminat u testing iehor irid isir.

- (ii) Ir-riżultat IF johroġ negattiv għall-kampjuni b'inqas minn 5×10^3 : għal kull ml ta' residwu risospiz u l-kampjun huwa meqjus bhala negattiv. Testing iehor mhux meħtieġ.

6. Test PCR

Prinċipji

Meta jsir it-test tal-PCR bhala t-test ta' skringing prinċipali u johroġ pożittiv, l-iżolament jew l-IF jrid isir bhala t-tieni test ta' skringing obligatorju. Meta l-PCR jintuża bhala t-tieni test ta' skringing u r-riżultat johroġ pożittiv, testijiet oħrajn skond l-iskema tal-proċeduri huma meħtieġa sabiex tkun kompluta d-dijanjozi.

Użu komplet ta' dan il-metodu bhala test ta' skringing prinċipali huwa rrikmandat meta esperjenza speċjalizzata għet miksuba.

Nota: Testijiet preliminari b'dan il-metodu jridu jaslu għall-sejba ta' 10^3 sa 10^4 ċelluli ta' *R. solanacearum* per ml miżjud ma' estratti ta' kampjuni li qabel harġu negattivi. Testijiet ta' ottimizzazzjoni jistgħu jinħtieġu sabiex livelli massimi ta' sensitività jin-kisbu u speċifità f'kull laboratorju.

Aghmel użu ta' reagġenti PCR u protokollu (ara Appendiċi 6). Jekk possibli aghzel metodi li fihom kontroll intern.

Hu prekawzjonijiet approprijati sabiex tevita kontaminazzjoni ta' kampjuni ma' DNA li qed ikun investigat. It-test tal-PCR irid isir minn esperti teknici, flaboratorji dedikati speċifikament għall-bijologija molekolari, halli wiehed inaqas kemm jista' jkun il-possibiltà ta' kontaminazzjoni ma' DNA li qed ikun investigat.

Kontrolli negattivi (għall-proċeduri ta' estrazzjoni ta' DNA u PCR) għandhom dejjem jiġu meqjusa bhala l-kampjun finali fil-proċedura, sabiex jaċċertaw il-preżenza ta' DNA minn sors iehor.

Il-kontrolli negattivi li ġejjin iridu jiġu inklużi fit-test tal-PCR:

- Estratt mill-kampjun li preċedament harġu negattivi għal *R. solanacearum*,
- Kontrolli għall-*buffer* użati għall-estrizzjoni tal-batterju u tad-DNA mill-kampjun,
- Tahlita mir-reazzjoni PCR.

Il-kontrolli pożittivi li ġejjin għandhom jiġu inklużi:

- Alikwoti ta' residwi risospizi li magħhom ġie miżjud il-*R. solanacearum* (għall-preparazzjoni ara Appendiċi 3 B).
- Sospensjoni ta' 10^6 ċellula għal kull ml ta' *R. solanacearum* fl-ilma minn iżolat ta' varjetà aggressiva (eż NCPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; ara Appendiċi 3 B).
- Jekk hu possibli uża wkoll DNA estratt minn kampjuni tal-kontrolli pożittivi fit-test tal-PCR.

Sabiex tiġi evitata l-possibiltà ta' kontaminazzjoni pprepara kontrolli pożittivi f'ambjent separat mill-kampjuni li ha jkunu ttestjati.

Estratti mill-kampjuni jridu jkunu kemm jista' jkun safja minn ħamrija. Għalhekk jista' jkun aħjar li wiehed jipprepara estratti minn patata maħsula jekk ser jintużaw protokollu ta' PCR.

Materjali ta' kontroll standardizzati pożittivi u negattivi li jstgħu jintużaw ma' dan it-test huma mfassla fl-Appendiċi 3.

6.1. Metodi ta' purifikazzjoni tad-DNA

Uża kampjuni ta' kontroll pożittivi u negattivi kif imfassal hawn fuq (ara Appendiċi 3)

Materjal ta' kontroll tat-test f'mod identiku b'hall-kampjun(i).

Hemm bosta metodi li jistgħu jintużaw għall-purifikazzjoni ta' DNA li qed jiġi ttestjat għalih minn sustrati tal-kampjun, b'hekk jitnehhew fatturi li jfixklu l-proċess PCR u reazzjonijiet enzimatiċi oħra u tiżdied il-koncentrazzjoni ta' DNA li qed tiġi ttestjata fil-kampjun ta' l-estratt. Il-metodu li ġej ġie ottimizzat għall-użu ma' metodi PCR validati mfassla f'Appendiċi 6.

(a) Metodi skond Pastrik (2000)

- 1) Qattar 220 μ l ta' buffer li jintuża għall-iproċessar f'unitajiet żgħar (*lysis buffer*) (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA [pH 8.0]) fi tubu Eppendorf ta' 1.5 ml.
- 2) Żid 100 μ l ta' l-estratt tal-kampjun u qiegħed fuq blokka shuna jew banjo shun ta' 95 °C għal 10 min.
- 3) Qiegħed it-tubu fis-silġ għal 5 min.
- 4) Żid 80 μ l soluzzjoni ta' stokk ta' lizożimi (50 mg Lizożimi per ml fi 10 mM Tris HCl, pH 8.0) u inkuba fi 37 °C għal 30 min.
- 5) Żid 220 μ l ta' soluzzjoni A ta' Easy DNA[®] (Invitrogen), hallat sew permezz ta' vortiči u inkuba fi 65 °C għal 30 min.
- 6) Żid 100 μ l ta' Easy DNA[®] solution B (Invitrogen), hallat permezz ta' vortiči bis-sahħa sakemm il-*precipitate* jimxi liberament fit-tubu u l-kampjun hu magħqud b'mod uniformi.
- 7) Żid 500 μ l ta' kloroform u vortex sakemm il-viskożità tonqos u t-tahlita hi omogenja.
- 8) Ghaddi minn ċentrifugazzjoni ta' 15 000 g għal 20 min fi 4 °C sabiex jisseparaw il-fażijiet separate minn stat ta' interfażi.
- 9) Ittrasferixxi l-fażi ta' fuq ġo tubu Eppendorf ġdid.
- 10) Żid ml wieħed ta' etanol 100 % (– 20 °C) hallat b'vortiči għal fitit u inkuba fuq silġ għal 10 minuti.
- 11) Iċċentrifuga b'15 000g għal 20 minuta fi 4 °C u nehhi l-etanol mir-residwu.
- 12) Żid 500 μ l 80 % ethanol (– 20 °C) u hallat billi taqleb it-tubu.
- 13) Iċċentrifuga b'15 000g għal 10 minuta fi 4 °C u nehhi l-etanol mir-residwu.
- 14) Halli r-residwu jinxef fl-arja jew f'*DNA speed vac*.
- 15) Erga' hallat ir-residwu f'100 μ l UPW sterili u halli f'temperatura tal-kamra għal mill-anqas 20 minuta.
- 16) Ahżen f'temperatura ta' – 20 °C sakemm ikun hemm b'zonn għal PCR.
- 17) Dawwar l-isfel il-*precipitate* abjad permezz ta' ċentrifugazzjoni u uża 5 μ l tas-*supernatant* li fih id-DNA għal PCR.

(b) Metodi oħra

Metodi oħra ta' estrazzjoni, eż Qiagen DNeasy Plant Kit, jistgħu jintużaw jekk jiġu pprovati li huma ugwalment effettivi fil-purifikazzjoni tad-DNA minn kampjuni ta' kontrolli li fihom 10^3 sa 10^4 ċellula ta'organizmu patoġeniku per ml.

6.2. PCR

- 6.2.1. Ipprepara mudelli ta' testjar u kontroll għall-PCR skond il-protokoll validati (Ara Taqsima VI.A.6.). Ipprepara deċimal ta' sostanza dilwita ta' estratt ta' kampjun tad-DNA (1:10 f'UPW).
- 6.2.2. Ipprepara t-tahlita ta' reazzjoni PCR appropjata f'ambjent hies minn kontaminazzjoni skond protokoll ppublika. (Appendiċi 6). Fejn hu possibli, huwa indikat li jintuza protokoll PCR multiplex li jinkorpora wkoll kontroll PCR intern.
- 6.2.3. Żid 2-5 µl ta' DNA extratt per 25 µl ta' reazzjoni ta' PCR f'tubi sterilizzati apposta skond protokoll PCR (ara Appendiċi 6)
- 6.2.4. Inkorpora kampjun ta' kontroll negattiv li fih tahlita ta' reazzjoni tal-PCR biss u žid l-istess sors ta' UPW kif kien uzat fit-tahlita tal-PCR minnflok il-kampjun.
- 6.2.5. Poġġi t-tubi fl-istess ciklatur termali li intuża fl-ittestjar preliminari u haddem il-programm PCR ottimizzat kif xieraq (Appendiċi 6).

6.3. Analizi tal-prodott PCR

- 6.3.1. Ifred l-amplikoni permezz ta' l-elektroforezi agarose gel. Haddem mill-anqas 12 µl tat-tahlita ta' reazzjoni tad-DNA amplifikata minn kull kampjun imhallat b'3 µl loading buffer (Appendiċi 6) f'2.0 % (w/v) agarose gels f'tris-acetate-EDTA (TAE) buffer (Appendiċi 6) f'5-8 V għal kull ċm. Uża marker tad-DNA xieraq, eż. '100 bp ladder'.
- 6.3.2. Ikxef faxxi ta' DNA billi ttebba' fi etilju bromide (0.5 mg per L) għal 30-60 minuta bil-prekawzjonijiet adegwati għal-manipulazzjoni ta' dan l-aġent mutanti.
- 6.3.3. Osserva l-gel imtebba' taht UV banda qasira transilluminazzjoni ($\lambda = 302 \text{ nm}$) għal prodotti PCR amplifikati tad-daqs mistenni (Appendiċi 6) u iddokumenta kollox.
- 6.3.4. Għas-sejbiet/każijiet kollha godda iwwerifika l-awtenticità ta' l-amplikon PCR billi twettaq analizi tar-restrizzjoni ta' l-enzimi fuq kampjun tad-DNA amplifikat li fadal billi tinkuba fl-aħjar temperatura u hin b'enzima u buffer xierqa (ara l-Appendiċi 6). Ifred il-frammenti diġeriti mill-elektroforezi bil-gel agarozu kif sar qabel u osserva d-disinn karatteristiku ta' restrizzjoni tal-frammenti taht il-UV transilluminazzjoni wara li jiġi mtebba' bl-etidjum bromide u qabel ma'kontrolli pożittivi diġeriti u mhux.

Interpretazzjoni tar-riżultat tat-test ta' l-PCR:

It-test tal-PCR huwa negattiv jekk l-amplikon PCR speċifiku ta' *R. solanacearum* -tad-daqs mistenni mhux osservat fil-kampjun in kwistjoni iżda jinstab għall-kontrolli pożittivi kollha (fil-każ ta' multiplex PCR bi primers ta' kontroll interni speċifiċ għall-pjanti: prodott PCR iehor ta' dimensjoni mistennija għandu jiġi amplifikat bil-kampjun in kwistjoni).

It-test PCR johroġ pożittiv jekk l-amplikon speċifiku PCR ta' *R. solanacearum* tad-daqs mistenni u d-disinn ta' restrizzjoni (meta mehtieg) huwa misjub, proviż li ma jiġix amplifikat minn kampjuni ta' kontroll negattivi. Konferma soda ta' riżultat pożittiv jista' jinkiseb ukoll billi it-test jerġa' jsir b'sett iehor ta' primers PCR (Appendiċi 6).

Nota: Tfixkil ta' PCR jista' jkun sospettat jekk l-amplikon mistenni jinkiseb mill-kontrolli pożittivi li fih *R. solanacearum* fl-ilma iżda riżultati negattivi jinkiseb minn kontrolli pożittivi ta' *R. solanacearum* minn estratt ta' patata. F'protokoll tal-PCR multiplex b'kontrolli tal-PCR interni, inibizzjoni tar-reazzjoni hi indikata meta l-ebda miż-żewġ amplifikons huma miksuba.

Il-kontaminazzjoni tista' tiġi suspettata jekk l-amplikon mistennija hu miksub minn waħda jew aktar tal-kontrolli negattivi.

7. Test FISH

Prinċipju:

Meta jsir it-test tal-PCR bhala t-test ta' skringing principali u johrog pożittiv, Izolazzjoni jew test IF jrid isir bhala t-tieni test ta' skringing obligatorju. Meta t-test ta' l-FISH jintuża bhala t-tieni test ta' skringing u r-riżultat johrog pożittiv, testijiet oħrajn skond l-iskema tal-proċeduri huma meħtieġa sabiex tkun kompluta d-dijanjozi.

Nota: Uża sondi validati *R. solanacearum* oligo speċifiċi. (ara Appendiċi 7). Testijiet preliminari b'dan il-metodu jridu jaslu għall-sejba ta' 10^3 sa 10^4 ċelluli ta' *R. solanacearum* per ml miżżjud ma' estratti ta' kampjuni li qabel harġu negattivi.

Il-proċedura li ġejja trid issir fuq estratt mill-kampjun frisk iżda jista' jsir ukoll b'suċċess fuq estratt ta' kampjun li kien ġie miżmum fil-gliċerol fi - 16 sa - 24 jew - 68 sa - 86 °C.

Bhala kontrolli negattivi, alikwoti ta' kampjuni ta' l-estratt li qabel harġu bhala testijiet negattivi għal *R. solanacearum* jistgħu jintużaw.

Bhala kontroll pożittiv ipprepara sospensjonijiet li fihom 10^5 sa 10^6 ċellula per ml ta' *R. solanacearum* biovar 2 (eż varjetà NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857, ara Appendiċi 3) fi 0.01M ta' *buffer* fosfat (PB) minn kolonja ta' 3-5 ijiem). Ipprepara pjastri ta' kontrolli pożittivi separati tal-varjetà omologa jew xi varjetà oħra bhala referenza ta' *R. solanacearum*, imhalta f'estratt tal-patata, kif speċifikat f'Appendiċi 3 B u mhux obligatorjament fi *buffer*.

L-użu ta' oligo sondi ewbatterjali immarkati FITC joffri kontroll għall-preżemza ta' ibridizzazzjoni, la tali proċess itebba' l-ewbatterji kollha li huma preżenti fil-kampjun.

Materjali ta' kontroll standardizzati pożittivi u negattivi li jistgħu jintużaw ma' dan it-test huma mfassla fi Appendiċi 3 A).

Materjal ta' kontroll tat-test f'mod identiku bhall-kampjun(i).

7.1. Fissaġġ ta' l-estratt tal-patata

Il-protokoll li ġej huwa bbażat fuq Wullings *et al.* (1998):

7.1.1. Ipprepara tahlil fissanti (ara Appendiċi 7).

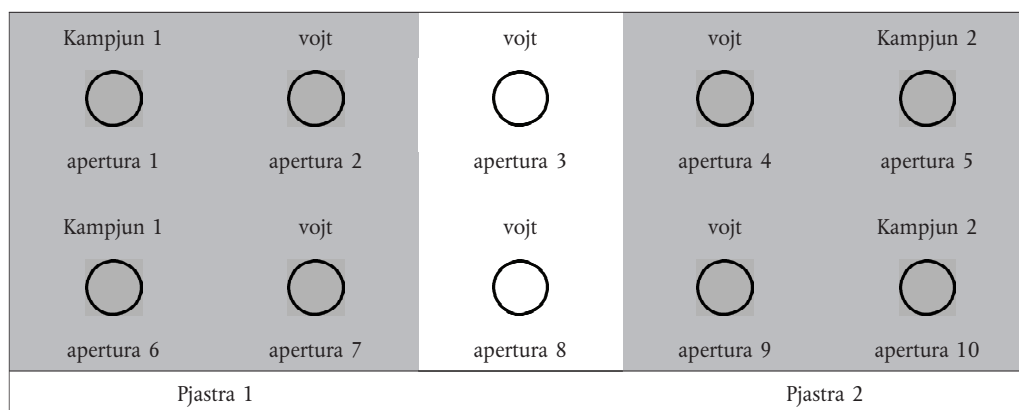
7.1.2. Qattar 100 µl ta' kull estratt tal-kampjun fi tubu Eppendorf u ċċentrifuga għal 7 minuti, velocità 7 000 g.

7.1.3. Nehhi l-likwidu supernatanti residwu u holl ir-residwu fi 200 µl ta' materjal fissattiv ippreparat <24 siegħa minn qabel. Hallat permezz ta' vortiči għal siegħa f'refrigerazzjoni.

7.1.4. Iċċentrifuga għal 7 minuti fi 7 000 g, nehhi l-likwidu residwu, supernatanti u erġa' holl parzjalment ir-residwu fi 75 µl 0.01M PB (ara Appendiċi 7).

7.1.5. Qattar tikek tat-tahlita riżultanti li ġiet iffissata fuq pjastra multitest nadifa kif imfassal fi dijagramma 7.1. Qieghed żewġ kampjuni differenti fuq kull pjastra, li mhumhiex dilwiti u uża 10 µl sabiex taqsmel dilwizzjoni ta' 1:100 (fi 0.01 M PB). mit-tahlil li jifdal tal-kampjun (49 µl) tista' tinżamm fi - 20 °C wara ż-żieda ta' volum wiehed ta' 96 % etanol. Jekk l-*assay* FISH jinhtieg' jerga' jsir, nehhi l-etanol permezz ta' ċċentrifugazzjoni u žid volum ugwali ta' 0.01 PB (hallat f'apparat ta' vortiči).

Dijagramma 7.1 Organizzazzjoni tal-pjastra għall-FISH



7.1.6. Nixxef il-pjastri fl-arja (jew fuq apparat apposta li jnixxef fi 37 °C) u ffixxa fuq in-nar.

F'dan l-istadju l-proċedura tista' tiġi sospiża u l-ibridizzazzjoni titkompla l-ġurnata ta' wara. Il-pjastri jridu jinżammu hielsa mit-trab u f'temperatura ambjentali.

7.2. Ibridizzazzjoni

7.2.1. Iġbed l-ilma minn ġewwa ċ-ċelluli fi serje ta' etanol fi gradi ta' 50 %, 80 % u 96 % għal minuta kull wiehed. Nixxef il-pjastri fl-arja fuq *holder* apposta.

7.2.2. Ipprepara kompartment ta' inkubazzjoni niedi billi tiksi l-qiegħ ta' kaxxa ssgillata b'karti assorbenti jew karta ta' filtrazzjoni mgħaddsa fi 1x hybmix (Appendiċi 7). Inkuba l-kaxxa minn qabel f'forn ta' l-ibridizzazzjoni temperatura ta' 45 °C għal mhux inqas minn 10 minuti.

7.2.3. Applika 10 µl ta' soluzzjoni ta' ibridizzazzjoni (Appendiċi 7) fi 8 aperturi (aperturi 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 u 10; ara Dij 7.1) ta' kull pjastra u halli żewġ aperturi tan-nofs vojta (3 u 8).

7.2.4. Poġġi l-għatu tal-ħġieġa (24 × 24 mm) fuq l-ewwel u l-aħħar erba' aperturi mingħajr ma tinqabad l-arja. Qiegħed il-pjastri fil-kompartiment niedi u msahhan u ibridizza għal hames sigħat fil-forn temperatura ta' 45 °C, fid-dlam.

7.2.5. Ipprepara 3 tazzi ta' litru wiehed ta' Milli Q ilma (grad molekolari), 1 l ta' 1x hybmix (334 ml 3x hybmix u 666 ml Milli Q water) u 1 l ta' 1/8x hybmix (42 ml 3x hybmix u 958. ml Milli Q water). Pre-inkuba kull wiehed fi banju temperatura ta' 45 °C.

7.2.6. Nehhi l-*coverslips* mill-pjastri u qiegħed il-pjastri fuq *holder* tal-pjastri apposta.

7.2.7. Lahlah is-sonda żejjed permezz ta' inkubazzjoni għal 15 il-minuta fit-tazza bi 1x hybmix temperatura ta' 45 °C.

7.2.8. Poġġi l-*holder* tal-pjastri fi 1/8 hybmix tahlil u inkuba għal 15 il-minuta oħra.

7.2.9. Billi il-pjastri brevement fi Milli Q soluzzjoni u qiegħdom fuq biċċa karta assorbenti. Nehhi l' umdità żejda billi tgħatti l-wiċċ b'biċċa karta assorbenti. Qattar 5-10 µl ta' tahlil montanti li ma tiċċarax (eż Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA jew ekwivalenti) fuq kull apertura u qiegħed coverslip kbir qies (24 × 60 mm) fuq il-pjastra kollha.

7.3. Interpretazzjoni tat-Test FISH

7.3.1. Osserva l-pjastri mill-ewwel permezz ta' mikroskopju mgħammar b'mikroskopija epifluworexxenti, qawwa ta' 630 jew 1 000 × immersjoni taht iż-żejt. B'filtru addattat għal *fluorescein isothiocyanate* (FITC) ċelluli ewbatterici, (inkluż ċelluli gram negattivi) fil-kampjun huma mtebbgħin lewn aħdar fluworexxenti. Taht filtru għal tetramethylrhodamine-5-isothiocyanate, Cy3-ċelluli imtebbgħin ta' *R. solanacearum* jidhru homor fluworexxenti. Qabbel il-morfologija taċ-ċelluli ma' dik tal-kontrolli pożittivi. Iċ-ċelluli jridu jidhru fluworexxenti jgħajjat u kompletament imtebbgħin. (Taqsim VI.A.7.)It-test FISH jrid jerga' jsir jekk it-tebgha hija aberrata. Osserva l-apertura billi thares ma' żewġ dijometri li huma perpendikulari ma' xulxin u mad-dawra perimetrika. Għal kampjuni li juru nuqqas jew f'it ċelluli osserva għall-inqas 40 aspett mikroskopiku.

7.3.2. Osserva għall-preżenza ta' ċelluli jleqq li għandhom morfologija karatteristika ta' *R. solanacearum* fl-apertura ta' testjar fuq il-pjastri. (ara portal <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). L-intensità fluworexxenti trid tkun daqs jew aħjar minn dik tal-varjetà fil-kontroll pożittiv. Ċelluli li huma mtebbgħin inkompletament jew bi fluworexxenza dgħajfa ma jridux jiġu meqjusa.

7.3.3. Jekk hemm suspett ta' kontaminazzjoni t-test irid jerga' jsir. Dan jista' jseħh meta l-pjastri kollha minn lott juru ċelluli pożittivi minhabba kontaminazzjoni tal-*buffer* jew jekk ċelluli pożittivi jinstabu (il-barra mill-apertura) fuq il-kisja tal-pjastra.

- 7.3.4. Hemm bosta problemi relatati ma' l-ispeċifità tat-test ta' l-FISH. Popolazzjonijiet oħra ta' ċelluli fluworexxenti b'morfologija atipika u batterji saprofitiċi reaġġenti bi morfologija u dimensjoni simili għal *R. solanacearum* jistgħu jinstabu fil-qalba tan-naha ta' l-għarqub u fi residwi mehudin minn segmenti taz-zkuk.
- 7.3.5. Ikkonsidra biss ċelluli fluworexxenti ta' qisien u morfologija tipika.
- 7.3.6. Interpretazzjoni tar-riżultat tat-test ta' l-FISH:
- (i) Riżultati validi tat-test tal-FISH jinkisbu jekk ċelluli jleqqu ħodor fluworexxenti ta' qisien u morfologija tipika ta' *R. solanacearum* huma osservati permezz tal-filtru FITC u ċelluli ħomor fluworexxenti bil-filtru rhodamine f'kull kontroll pożittivu mhux f'ebda kontroll negattiv. Jekk jinstabu ċelluli fluworexxenti bi morfologija karatteristika, hu stima tan-numru ta' ċelluli tipiċi per firxa mikroskopika u kkalkula n-numru ta' ċelluli tipiċi per ml ta' residwu imhallat mill-ġdid (Appendiċi 4). Kampjuni li fihom mill-inqas 5×10^3 ċellula tipika per ml ta' residwu imhallat mill-ġdid huma kkonsidrati potenzjalment ikkontaminati. Tetsijiet oħrajn mhux meħtieġa. Kampjuni li fihom inqas minn 5×10^3 ċellula tipika per ml ta' residwu imhallat mill-ġdid huma kkonsidrati negattivi..
- (ii) It-test FISH huwa negattiv jekk ċelluli jleqqu ħomor fluworexxenti b'qisien u morfologija tipika ta' *R. solanacearum* ma jidhrux bil-filtru rhodamine, dejjem jekk ċelluli jleqqu ħomor fluworexxenti tipiċi huma osservati fil-kontrolli pożittivi meta jintuża l-filtru rhodamine.

8. Testijiet ELISA

Prinċipju:

ELISA jista' jintuża bħala test ottimali meta miżjud ma' IF, PCR jew FISH minhabba sensitività relattivament baxxa ta' dan it-test. Meta jintuża DAS ELISA kundizzjonijiet ta' sostanzjament u antikorpi monoklonali huma obbligatorji. (ara l-portal <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Trobbija tal-kampjuni f'kundizzjonijiet ta' sostanzjament huma meħtieġa sabiex is-sensitività tat-test jiġi ddied, iżda jista' ma jirrikmandi minhabba kompetizzjoni minn organiżmi oħra fil-kampjun.

Nota: Uża sors ta' antikorpi validati ta' *R. solanacearum* (ara l-portal <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Huwa rikmandat li d-dożar jiġi kkalkulat għal kull lott ta' antikorpi. Id-dożar jissejjaħ bħala l-ogħla fattur ta' dilwizzjoni fejn issir ir-reazzjoni ottimali meta jiġi ttestjat it-tahlita solida u likwida li fiha 10^5 sa 10^6 ċelluli per ml ta' varjetà omologa ta' *R. solanacearum* meta jintuża konjugat approprijat ta' antikorpi sekondarji skond ma jirrikmandi l-manufattur. Waqt it-test, l-antikorpi jridu jintużaw dilwiti f'dilwizzjoni li toqrob jew li taqbel eżattament mal-formolazzjoni kummerċjali.

Sib id-dożar ta' antikorpi f'sospensjoni ta' 10^5 sa 10^6 ċellula per ml tal-varjetà omolga tar-*R. solanacearum*.

Inkludi kampjun ta' l-estratt li qabel hareġ negattiv għal *R. solanacearum* u sospensjoni ta' batterji li ma jirreaġġux ma' xulxin fi soluzzjoni ta' phosphate buffered saline bħala kontroll negattiv.

Bħala kontrolli pożittivi uża alikwoti ta' l-estratt tal-kampjun, li qabel ittestja negattiv, li jithallat ma' 10^3 sa 10^4 ċellula għal kull ml ta' *R. solanacearum* bijovar 2 (eż varjazzjoni NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857, ara Appendiċi 2 A u B). Għat-tqabbil tar-riżultati fuq kull pjastra uża sospensjoni standard ta' 10^5 sa 10^6 ċellula għal kull ml fi PBS ta' *R. solanacearum* Accerta kontrolli pożittivi jinżammu separata fuq pjastra mikrotitru mill-kampjun (i) li qed jiġi(u) ttestjat(i).

Materjali ta' kontroll standardizzati pożittivi u negattivi disponibbli għall-użu ma' dan it-test huma elenkati fl-Appendiċi 3 A.

Materjal ta' kontroll tat-test f'mod identiku bhall-kampjun(i).

Żewġ protokollu ELISA ġew validati.

(a) ELISA indirett (Robinson Smith et al., 1995)

- 1) Uża 100-200 μ l alikwoti ta' l-estratt tal-kampjun. (Tishin f'temperatura ta' 100 °C għal erba' minuti banju-marija jew f'heating block jista' f'xi każi jnaqqas ir-riżultati non-specifici).
- 2) Żid volum indaqs ta' double strength coating buffer (Appendiċi 4) u ħallat permezz ta' vortici.
- 3) Applika 100 μ l alikwoti lil kull wieħed minn mill-anqas 2 ħofor ta' pjastra ta' mikrotritazzjoni (eż Nunc-Polysorp jew l-ekwivalenti) u poġġi f'inkubatur għal siegħa f'temperatura ta' 37 °C jew matul il-lejl f'temperatura ta' 4 °C.

- 4) Ohroġ f'daqqa l-estratti mill-hofor. Aħsel il-hofor tliet darbiet bil-PBS-Tween (Appendiċi 4), billi thalli l-aħħar sustanza tal-hasil fil-hofor għal mill-anqas 5 minuti.
- 5) Ipprepara s-sustanza dilwita ta' antikorpi xierqa kontra r-R. *solanacearum* f'blocking buffer (Appendiċi 4). Għall-antikorpi kummerċjali validati, uża s-sustanza dilwita rrikmandata (normalment ikkonċentrata darbtejn aktar mid-dożar).
- 6) Żid 100 µl lil kull hofra u poġġi f'inkubatur għal siegħa f'temperatura ta' 37 °C.
- 7) Ohroġ f'daqqa t-tahlil ta' l-antikorp mill-hofor u aħsel bħal qabel (4)).
- 8) Ipprepara s-sustanza dilwita xierqa ta' konjugati fosfati sekondarji ta' antikorpi alkalini fil-blocking buffer. Żid 100 µl lil kull hofra u poġġi f'inkubatur għal siegħa f'temperatura ta' 37 °C.
- 9) Ohroġ f'daqqa l-antikorp konjugat mill-hofor u aħsel bħal qabel (4)).
- 10) Żid 100 µl tahlil sustrat alkalini fosfat (Appendiċi 4) lil kull hofra. Poġġi f'inkubatur fid-dlam f'temperatura ambjentali u aqra l-assorbenza f'405 nm f'intervalli regolari fi żmien 90 minuta.

(b) DASI ELISA

- 1) Ipprepara t-tahlila dilwita ta' anti-R. *solanacearum* polyclonal immunoglobulins xierqa f'coating buffer pH 9.6 (Appendiċi 4). Żid 200 µl lil kull hofra. Poġġi f'inkubatur f'temperatura ta' 37 °C għal 4-5 sigħat jew f'temperatura ta' 4 °C għal 16-il siegħa.
- 2) Aħsel il-hofor tliet darbiet bil-PBS-Tween (Appendiċi 4).

Żid 190 µl ta' l-estratt tal-kampjun lil mill-anqas 2 hofor. Żid ukoll kontrolli pożittivi u negattivi f'żewġ hofriet għal kull pjastra. Poġġi f'inkubatur għal 16-il siegħa f'temperatura ta' 4 °C.
- 3) Aħsel il-hofor tliet darbiet bil-PBS-Tween (Appendiċi 4).
- 4) Ipprepara sustanza dilwita xierqa ta' antikorpi monoklonali R. *solanacearum*-specifiċi fil-PBS (appendiċi 4) li fih ukoll 0.5 % ta' albumina sjeru bovin (BSA) u żid 190 µl lil kull hofra. Poġġi f'inkubatur f'temperatura ta' 37 °C għal sagħtejn.
- 5) Aħsel il-hofor tliet darbiet bil-PBS-Tween (Appendiċi 4).
- 6) Ipprepara sustanza dilwita xierqa ta' anti-mouse immunoglobulins magħquda ma' fosfati alkalini fil-PBS. Żid 190 µl lil kull hofra. Poġġi f'inkubatur f'temperatura ta' 37 °C għal sagħtejn.
- 7) Aħsel il-hofor tliet darbiet bil-PBS-Tween (Appendiċi 4).
- 8) Ipprepara tahlil ta' sustrat fosfat alkalini li fiha 1 mg p-nitrophenyl phosphate għal kull ml ta' sustrate buffer (Appendiċi 4). Żid 200 µl lil kull hofra. Poġġi f'inkubatur fid-dlam f'temperatura ambjentali u aqra l-assorbenza f'405 nm f'intervalli regolari fi żmien 90 minuta.

Interpretazzjoni tar-riżultati tat-test ELISA:

It-test ELISA hu negattiv jekk il-qari tad-densità ottika medja (OD) minn kampjuni tal-hofor duplikati huwa $< 2 \times OD$ ta' dak fil-hofra ta' kontroll ta' l-estratt ta' kampjun negattiv, bil-kundizzjoni li l-OD għall-kontrolli pożittivi huma kollha aktar minn 1.0 (wara 90 minuta ta' inkubazzjoni bis-sustrat) u huma akbar minn darbtejn l-OD miksub għall-estratti ta' kampjun negattiv.

It-test ELISA huwa pożittiv jekk il-qari ta' l-OD medju mill-kampjuni duplikati tal-hofor huwa $> 2 \times OD$ fil-hofra ta' l-estratt tal-kampjun negattiv bil-kundizzjoni li l-qari OD fil-hofor ta' kontroll negattiv kollha huma $< 2 \times OD$ ta' dawk fil-hofor ta' kontroll pożittiv.

Qari ta' l-ELISA negattiv fil-hofor ta' kontroll pożittiv jindikaw li t-test ma ġiex magħmul korrettament jew li dan ġie inibid. Qari ta' l-ELISA pożittivi fil-hofor ta' kontroll negattiv jindikaw li sehhet kontaminazzjoni bejniethom jew li sehhet ghaqda ta' l-antikorpi mhux speċifika.

9. Test Bioassay

Nota: Ittestjar preliminari permezz ta' dan il-metodu għandu jippermetti detezzjoni riproducibbli ta' 10^3 sa 10^4 ta' unitajiet ta' formazzjoni ta' kolonji ta' *R. solanacearum* għal kull ml miżjud lill-estratti ta' kampjuni li qabel ittestjaw negattiv (preparazzjoni ara l-Appendiċi 3).

L-ogħla sensitività ta' osservazzjoni tista' tkun mistennija meta tuża estratti ta' kampjuni ppreparati friski u kundizzjonijiet ta' żvilupp ottimali. Iżda, il-metodu jista' jiġi applikat b'suċċess lill-estratti li ġew miżmuma fil-glicerol f'temperatura ta' bejn -68 sa -86 °C.

Il-protokoll li ġej hu bbażat fuq Janse (1988):

- 9.1. Uża 10 pjanti ta' l-ittestjar minn kultivazzjoni ta' tadam suxxettibbli (eż *Moneymaker* jew *cultivar* b'suxxettibilità ekwivalenti kif determinat mil-laboratorju ta' l-ittestjar) fit-tielet stadju *true leaf* għal kull kampjun. Għal dettalji tat-tkabbir, ara l-Appendiċi 8. Bħala alternattiva, uża brunġiel (eż *cultivar* Black Beauty jew *cultivars* li fihom suxxettibilità ekwivalenti), uża biss pjanti fil-*leaf stage* 2-3 sa l-espansjoni shiha tat-tielet stadju *true leaf*. Ġie muri li s-sintomi kienu anqas severi u li dawn jiżviluppaw aktar bil-mod fil-pjanta tal-brunġiel. Fejn hu possibbli, huwa għalhekk irrikmandat li jintużaw nebbieta tat-tadam.

- 9.2. Iddistribwixxi 100 µl ta' estratt tal-kampjun bejn il-pjanti ta' l-ittestjar.

9.2.1. Tilqim bis-siringa

Laqqam iż-żkuk tal-pjanta eżatt fuq il-kotiledoni bl-użu ta' siringa mghammra b'labra ipodermika (mhux anqas minn 23G). Iddistribwixxi l-kampjun bejn il-pjanti ta' l-ittestjar

9.2.2. Tilqim permezz ta' ticrita żghira

Billi żzomm il-pjanta bejn żewġt iswaba, qattar qatra (bejn wiehed u iehor 5-10 µl) tar-residwu sospiż (*suspended pellet*) fuq iz-zokk bejn il-kotiledoni u l-ewwel werqa.

Permezz ta' skalpell sterilizzat, għamel ticrita żghira dijagonali, ta' madwar 1.0cm għat-tul u ta' bejn wiehed u iehor 2/3 tal-fond tal-hxuna taż-żokk, billi tibda l-qatgħa minfejn toħroġ l-ewwel qatra.

Issiġilla l-qatgħa b'vazelina sterili minn siringa.

- 9.3. Permezz ta' l-istess teknika, laqqam 5 nebbieta b'tahlita ta' l-ilma ta' 10^5 sa 10^6 ċelluli għal kull ml preparat minn kultivazzjoni ta' 48 siegħa ta' varjazzjoni aggressiva *biovar* 2 ta' *R. solanacearum* bħala kontroll pożittiv u b'*pellet buffer* (Appendiċi 4) bħala kontroll negattiv. Issepara l-pjanti ta' kontroll negattiv u pożittiv mill-pjanti l-oħra sabiex jiġi evitat kontaminazzjoni bejniethom.

- 9.4. Kabbar il-pjanti ta' l-ittestjar f'faċilitajiet ta' kwarantina sa 4 ġimgħat f'temperatura ta' 25-30 °C u f'umdità relattiva għolja b'saqi addattat sabiex jiġi evitat li jinfaqqghu jew li jitbielu min-nuqqas ta' ilma. Sabiex tevita l-kontaminazzjoni, poġġi l-pjanti ta' kontroll pożittiv u dawk negattiv f'inkubatur fuq bankijiet isseparati b'mod ċar ġewwa serra jew kamra tat-tkabbir jew, fejn l-ispazju huwa limitat, assigura li jkun hemm separazzjoni stretta bejn it-trattamenti. Jekk pjanti għall-kampjuni differenti għandhom jiġu poġġuti f'inkubatur viċin xulxin, sseparahom permezz ta' skrinijiet adattati. Meta tkun qed tiffertilizza, tispezzjona u manipolazzjonijiet oħra, oghqod attent hafna sabiex tevita l-kontaminazzjoni bejniethom. Hu essenzjali li s-serer u l-kmamar tat-tkabbir jinżammu nieqsa minn kull insetti għaliex dawn jistrasmettu l-batterju minn kampjun għal kampjun.

Osserva għal sintomi ta' titbil, epinastija, klorozi u/jew twaqqif ta' l-iżvilupp.

- 9.5. Iżola minn pjanti infettati (Sezzjoni II.3.) u identifika kultivazzjonijiet purifikati ta' *R. solanacearum* preżunt (Sezzjoni VI.B.).
- 9.6. Jekk ma jiġux osservati sintomi wara 3 ġimgħat, eżegwixxi *IF/PCR/Izolazzjoni* fuq kamjun kompost ta' sezzjonijiet taz-zokk ta' 1 ċm ta' kull pjanta ta' l-ittestjar meħud aktar 'il fuq mis-sit tat-tilqima. Jekk it-test jirriżulta pożittiv, eżegwixxi metodu ta' kisja b'dilwizzjoni.
- 9.7. Identifika kwalunkwe kultivazzjonijiet purifikati ta' *R. solanacearum* preżunti (Sezzjoni VI.B.).

Interpretazzjoni tar-riżultati tat-test bioassay

Riżultati tat-test *Bioassay* validi huma miksuba meta pjanti tal-kontrolli pożittivi juru sintomi tipiċi, il-batterju jista' jiġi iżolat mill-ġdid minn dawn il-pjanti u l-ebda sintomi ma jinsabu fil-kontrolli negattivi.

It-test *Bioassay* huwa negattiv jekk il-pjanti ta' l-ittestjar m'humiex infettati minn *R. solanacearum*, u sakemm *R. solanacearum* huwa osservat f'kontrolli pożittivi.

It-test *Bioassay* huwa pożittiv jekk il-pjanti ta' l-ittestjar huma infettati minn *R. solanacearum*.

B. TESTIJET TA' IDENTIFIKAZZJONI

Identifika kultivazzjonijiet puri ta' kostitwenti iżolati ta' *R. solanacearum* preżunti billi tuża għalmenu tnejn mit-testijiet li ġejjin bażati fuq prinċipji bijoloġiċi differenti.

Inkludi varjazzjonijiet ta' referenza magħrufa fejn hu xieraq għal kull test imwettaq (ara l-Appendiċi 3).

1. Testijiet ta' identifikazzjoni nutrizzjonali u enzimatiċi

Iddetermina l-proprjetajiet fenotipiċi li ġejjin, li huma preżenti b'mod universali jew assenti fl-*R. solanacearum*, skond il-metodi ta' Lelliott u Stead (1987), Klement *et al.* (1990), Schaad (2001)

Test	Riżultat mistenni
Produzzjoni tal-pigment fluworexenti	-
Inkluzzjonijiet Poly-βhydroxybutyrate	+
Test ta' Ossidazzjoni/Fermentazzjoni (O/F)	O+/F-
Attività ta' Katalaži	+
Test ta' Ossidazzjoni ta' Kovac	+
Riduzzjoni tan-nitrat	+
Utilizzazzjoni taċ-ċitrat	+
Tkabbir ftemperatura ta' 40.000000 °C	-
Tkabbir f1 % NaCl	+
Tkabbir f2.000000 % NaCl	-
Attività ta' di-idrolaži arginina	-
Likwifikazzjoni tal-ġelatina	-
Idrolisi tal-lamtu	-
Idrolisi aesculin	-
Produzzjoni tal-levan	-

2. Test IF

- 2.1. Ipprepara tahlita ta' ċelluli ta' madwar 10^6 għal kull ml f'*IF buffer* (Appendiċi 4).
- 2.2. Ipprepara sustanza dilwita għal darbtejn ta' antisjeru xieraq (ara l-portal <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).
- 2.3. Applika l-proċedura *IF* (Sezzjoni VI.A.5.).
- 2.4. Test *IF* pożittiv jinkiseb jekk id-dożar *IF* tal-kultivazzjoni huwa ekwivalenti għal dak tal-kontrolli pożittivi.

3. Test ELISA

Nota: Jekk qed teżegwixxi 2 testijiet ta' identifikazzjoni biss, tużax test serologiku addizzjonali għal dan il-metodu.

- 3.1. Ipprepara tahlita ta' ċelluli ta' madwar 10^8 għal kull ml f'1X PBS (Appendiċi 4).
- 3.2. Eżegwixxi proċedura ELISA xierqa b'antikorp ta' monoklonu speċifiku għal *R. solanacearum*.
- 3.3. Test ELISA pożittiv huwa miksub jekk il-qari ta' l-ELISA miksub mill-kultivazzjoni tkun ta' mill-anqas nofs dik miksuba għall-kontroll pożittiv.

4. Test PCR

- 4.1. Ipprepara tahlita ta' ċelluli ta' madwar 10^6 għal kull ml filma sterili ta' grad molekulari.
- 4.2. Sahhan 100 μ l tat-tahlita ta' ċelluli ftubi magħluqa f'heating block jew banjumarija jagħli f'temperatura ta' 100 °C għal 4 minuti. Il-kampjuni jistgħu imbagħad jiġu mahżuna f'temperatura ta' -16 sa -24 °C sakemm ikun hemm bżonn.
- 4.3. Applika proċeduri PCR xierqa sabiex tamplifika l-amplikoni ta' speċifità *R. solanacearum* (eż Seal *et al.* (1993); Pastrik and Maiss (2000); Pastrik *et al.* (2002); Boudazin *et al.* (1999); Opina *et al.* (1997), Weller *et al.* (1999).
- 4.4. Identifikazzjoni pożittiva ta' *R. solanacearum* tinkiseb jekk l-amplikoni tal-PCR huma ta' l-istess daqs u għandhom l-istess poliformiżmi ta' tul ta' restrizzjoni tal-framment bħal dak għall-varjazzjoni ta' kontroll pożittiv.

5. Test FISH

- 5.1. Ipprepara tahlita ta' madwar 10^6 ċelluli għal kull ml f'UPW.
- 5.2. Applika l-proċedura FISH (Sezzjoni VI.A.7.) b'għalmenu 2 2. Oligo Sondi speċifiċi għal *R. Solanacearum* (Appendiċi 7).
- 5.3. Test FISH pożittiv hu miksub jekk l-istess reazzjonijiet huma miksuba mill-kultivazzjoni u l-kontroll pożittiv.

6. Identifikazzjoni skond it-tip ta' aċidi grassi (FAP)

- 6.1. Kabbar il-kultivazzjoni fuq *trypticase soy agar* (Oxoid) għal 48 siegħa f'temperatura ta' 28 °C.
- 6.2. Applika proċedura FAP xierqa (Janse, 1991; Stead, 1992).
- 6.3. Test FAP pożittiv jinkiseb jekk il-profil tal-kultivazzjoni preżunta huwa identiku għal dik tal-kontroll pożittiv. Il-preżenza ta' aċidi grassi karatteristiċi huma 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH u 18:1 2OH u l-assenza ta' 16:0 3OH hija indikattiva hafna ta' l-ispeċi *Ralstonia*.

7. Metodi ta' karatterizzazzjoni tal-varjetà

Il-karatterizzazzjoni tal-varjetà permezz ta' l-użu ta' waħda mill-metodi li ġejjin hija irrikmandata għal kull każ ġdid ta' iżolazzjoni ta' *R. solanacearum*.

Inkludi varjazzjonijiet ta' referenza magħrufa fejn hu xieraq għal kull test imwettaq (ara l-Appendiċi 3.)

7.1. Determinazzjoni Biovar

R. solanacearum huwa sseparat f'biovars a bażi ta' l-abilità li tutilizza u/jew tossidizza tliet *disaccharides* u tliet alkoliċi *hexose* (Hayward, 1964 and Hayward *et al.*, 1990). Medja tal-kultivazzjoni għat-test bijovar huwa mfassal fl-Appendiċi 2. It-test jista' jsir b'suċċess permezz ta' innoklazzjoni billi l-medja tittniffed b'kulturati safja ta' iżolati ta' *R. solanacearum* u inkubati fi 28 °C. Jekk il-medji huma mqassma f'pjastru ta' kultivazzjoni fejn iċ-ċelluli jitrabbew f'ħofor, li kull pjastra fiha 96-il ħofra sterili (200 μ l għal kull ħofra) tiddil fil-kultur minn aħdar żebbuġa għal isfar jista' jiġi osservat f'72 siegħa, li jindika riżultat pożittiv tat-test.

	Biovar				
	1	2	3	4	5
L-utilizzazzjoni ta'					
Maltosju	-	+	+	-	+
Lattosju	-	+	+	-	+
D (+) Cellobiose	-	+	+	-	+
Mannitol	-	-	+	+	+
Sorbitol	-	-	+	+	-
Dulcitol	-	-	+	+	-

Testijiet oħrajn jiddifferenzjaw il-biovar 2 subfenotipi

	Biovar 2A (distribuzzjoni madwar id- dinja)	Biovar 2A (Li tinsab fiċ-Ċile u l-Kolombja)	Biovar 2T (Li tinsab f'spazji tropikali)
Utilizzazzjoni tat-trehalose	-	+	+
Utilizzazzjoni tal-meso-inositol	+	-	+
Utilizzazzjoni ta'D ribose	-	-	+
Attività Pektolitika (1)	baxxa	baxxa	għoli.

(1) Ara Lelliott and Stead (1987)

7.2. Tehid tal-marki tas-swaba Genomic

Divrenzar molekulari ta' varjazzjonijiet fil-kompless *R. solanacearum* jistgħu jinkisbu permezz ta' l-użu ta' bosta tekniċi, inkluż:

7.2.1. L-analiżi *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) (Cook *et al.*, 1989)

7.2.2. Sekwenza ripetittiva PCR permezz ta' l-użu tal-primers REP, BOX u ERIC (Louws *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995).

7.2.3. L-analiżi *amplified fragment length polymorphism* (AFLP) (Van der Wolf *et al.*, 1998).

7.3. Metodi PCR

Primers speċifiċi PCR (Pastrik *et al.*, 2002; ara l-Appendiċi 6) jistgħu jintużaw sabiex jiddifferenzjaw varjazzjonijiet li jappartjenu lid-diviżjoni 1 (biovars 3, 4 ad 5) u diviżjoni 2 (biovars 1, 2A and 2T) ta' *R. solanacearum*, kif definit originarjament mill-analiżi RFLP (Cook *et al.*, 1989) u s-sekwenzar 16S rDNA (Taghavi *et al.*, 1996).

C. TEST TA' KONFERMA

It-test ta' patoġenicità għandu jkun eżegwit bħala konferma finali ta' djanjosi ta' *R. solanacearum* u għall-valutazzjoni ta' l-aggessività tal-kultivazzjonijiet identifikati bħala *R. solanacearum*.

1) Ipprepara inokulu ta' ċelluli ta' madwar 10^6 għal kull ml minn kultivazzjoni ta' bejn l-24-48 siegħa ta' l-iżolat li għandha tiġi ttestjata u varjazzjoni ta' kontroll pożittiva xierqa ta' *R. solanacearum* (e.ż. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; ara l-Appendiċi 3).

2) Laqqam 5-10 tadam suxxettibbli jew nebbieta tal-pjanta tal-brunġiel fit-tielet *true leaf stage* (ara Sezzjoni VI.A.9).

- 3) Poġġi f'inkubatur sa ġimghatejn f'temperatura ta' 25-28 °C u umdità relattiva għolja b'saqi xieraq sabiex jiġi evitat tifqigh jew stress tat-tbiela. Fil-każ ta' kultivazzjonijiet puri, tbiela tipika għandha ssehh fi żmien 14-il gurnata. Jekk wara dan il-perjodu s-sintomi m'humiex preżenti, il-kultivazzjoni ma tistax tiġi kkonfermata b'hal forma patoġenika ta' *R. solanacearum*
 - 4) Osserva għal sintomi ta' titbil, epinastija, klorozi u/jew twaqqif ta' l-iżvilupp.
 - 5) Iżola minn pjanti sintomatiċi billi tneħhi sezzjoni taz-zokk madwar 2 ċm fuq il-punt tat-tilqima. Farrak u hallat f'volum żgħir t'ilma distillat sterili jew 50 mM *buffer* tal-fosfat (Appendiċi 4). Iżola mit-taħlita permezz tat-tifrix jew strikjar tas-sustanza dilwita fuq medju adattat, preferibbilment fuq medju magħżul (Appendiċi 2), poġġi f'inkubatur għal 48-72 siegħa f'temperatura ta' 28 °C u osserva l-formazzjoni ta' kolonji tipiċi ta' *R. solanacearum*.
-

Appendici 1

Laboratorji involuti fl-ottimizzazzjoni u l-validazzjoni tal-protokoll

Laboratorju ⁽¹⁾	Lokalità	Pajjiż
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Vjenna u Linz	l-Awstrija
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	il-Belġju
Plantedirektoratet	Lyngby	Id-Danimarka
Central Science Laboratory	York	Ingilterra
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburgh	Skozja
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	Franza
Laboratoire national de la protection des végétaux, Station de quarantaine de la pomme de terre	Le Rheu	Franza
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	il-Ġermanja
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	il-Ġermanja
State Laboratory	Dublin	L-Irlanda
Dipartimento di Scienze e tecnologie Agroambientali	Bologna	l-Italja
Regione Veneto Unità Periferica per i Servizi Fitosanitari	Verona	l-Italja
Nederlandse Algemene Keuringsdienst	Emmeloord	L-Olanda
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	L-Olanda
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lisbona	il-Portugall
Centro Diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	Spanja
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias	Valencia	Spanja
Swedish University of Agricultural Sciences	Uppsala	l-Isvezja

⁽¹⁾ Kuntatt tax-xjentisti: ara l-portal <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

Appendiċi 2

Medji għall-iżolazzjoni u kultivazzjoni ta' *R.solanacearum***(a) Medja ta' tkabbir generali***Nutrijent Agar (NA)*

Nutrijent Agar (Difco)	23,0 g
Ilma distillat	1,0 L

Iddissolvi l-ingredjenti u sterilizza permezz ta' l-*autoclaving* f'temperatura ta' 121 °C għal 15-il minuta.

Yeast Peptone Glucose Agar (YPGA)

Estratt tal-lamtu (Difco)	5,0 g
Bacto-Peptone (Difco)	5,0 g
D(+) Glukosju (<i>monoidratat</i>)	10,0 g
Bacto-Agar (Difco)	15,0 g
Ilma distillat	1,0 L

Iddissolvi l-ingredjenti u sterilizza permezz ta' l-*autoclaving* f'temperatura ta' 121 °C għal 15-il minuta.

Sucrose Peptone Agar (SPA)

Zokkor tal-kannamieli	20,0 g
Bacto-Peptone (Difco)	5,0 g
K ₂ HPO ₄	0,50 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g
Bacto-Agar (Difco)	15,0 g
Ilma distillat	1,0 L
pH 7,2 - 7,4	

Iddissolvi l-ingredjenti u sterilizza permezz ta' l-*autoclaving* f'temperatura ta' 121 °C għal 15-il minuta.

Medju Tetrazolium ta' Kelman

Acidi Casamino (Difco)	1,0 g
Bacto-Peptone (Difco)	10,0 g
Destrosju	5,0 g
Bacto-Agar (Difco)	15,0 g
Ilma distillat	1,0 L

Iddissolvi l-ingredjenti u sterilizza permezz ta' l-*autoclaving* f'temperatura ta' 121 °C għal 15-il minuta.

Halli jiksah sa 50 °C u zid tahlita sterilizzata permezz tal-filtru ta' 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (*Sigma*) sabiex tottjeni konċentrazzjoni finali ta' 50mg għal kull L.

(b) Medji ta' tkabbir selettiv validat

Medju SMSA (Englebrecht, 1994 kif modifikat minn Elphinstone et al., 1996)

Medju Basal

Acidi Casamino (Difco)	1,0 g
Bacto-Peptone (Difco)	10,0 g
Gliċerol	5,0 ml
Bacto-Agar (Difco) ara Nota 2.	15,0 g
Ilma distillat	1,0 L

Iddissolvi l-ingredjenti u sterilizza permezz ta' l-*autoclaving* f'temperatura ta' 121 °C għal 15-il minuta.

Kessaħ għal 50 °C u zid tahlita ta' stokk ta' l-ilma sterilizzat permezz tal-filtru ta' l-ingredjenti li ġejjin sabiex tikseb il-koncentrazzjonijiet finali speċifikati:

Crystal Violet (Sigma)	5,0 mg għal kull L
Polymixin-B-Sulphate	(Sigma P-1004) 600 000 U (madwar 100 mg) għal kull L
Bacitracin (Sigma B-0125)	1 250 U (madwar 25.0 mg) għal kull L
Chloramphenicol (Sigma C-3175)	5,0 mg għal kull L
Penicillin-G (Sigma P-3032)	825 U (madwar 0.5 mg) għal kull L
2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (Sigma)	50mg għal kull L

Nota:

1. L-użu ta' reaġenti oħra minbarra dawk speċifikati hawn fuq jistgħu jiffettwaw it-tkabbir ta' *R.solanacearum*.
2. Oxoid Agar #1 jista' jintuża minflok Bacto-Agar (Difco). F'dan il-każ it-tkabbir ta' *R.solanacearum* se jkun aktar bil-mod, anki jekk it-tkabbir ta' s'aprofiti li qed jikkompetu jista' wkoll jiġi ridott. Kolonji tipiċi ta' *R.solanacearum* jistgħu jiehdu minn ġurnata sa jumejn biex jiffurmaw u l-kolorazzjoni hamra tista' tkun aktar ċara u aktar diffuża minn fuq Bacto-Agar.
3. Żieda fil-koncentrazzjoni ta' bacitracin għal 2 500 U għal kull L jista' jnaqqas il-popolazzjonijiet ta' batterji li qed jikkompetu minghajr ma jaffettwa t-tkabbir ta' *Ralstonia solanacearum*.

Żomm il-medji u t-tahliliet stokk ta' antibijotiċi f'temperatura ta' 4 °C fid-dlam u uża fi żmien xahar.

Il-pjastri m'għandhux ikollhom kondensazzjoni fil-wiċċ qabel ma jintużaw.

Evita t-tnixxif eċċessiv tal-pjastri.

Il-kontroll tal-kwalità għandha ssir wara l-preparazzjoni ta' kull numru ġdid ta' medju permezz tat-tqeghid ta' tahlita ta' kultivazzjoni ta' referenza ta' *R.solanacearum* (ara l-Appendiċi 3) u permezz ta' l-osservanza ta' kolonji tipiċi wara l-inkubazzjoni f'temperatura ta' 28 °C għal 2-5 ġranet.

(c) **Medji ta' arrikkiment validat**

SMSA Broth (Elphinstone *et al.*, 1996)

Ipprepara bl-istess mod kif għall-medju SMSA *selective agar* iżda halli barra l-Bacto-Agar u t-2,3,5-tetrazolium chloride.

Modified Wilbrink broth (Caruso *et al.*, 2002)

Zokkor tal-kannamieli	10,0 g
Proteose peptone	5,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,25 g
NaNO ₃	0,25 g
Ilma distillat	1 L

Sterilizza permezz ta' l-*autoclaving* f'temperatura ta' 121 °C għal 15-il minuta u kessaħ sa 50 °C

Żid tahlit ta' stokk ta' antibijotiċi bl-istess mod kif għall-SMSA broth.

Appendiċi 3

A. Materjal ta' kontroll standardizzat kummerċjalment disponibbli

(a) *Izolanti batteriċi*

L-izolanti batteriċi li ġejjin huma rikkmandati għall-użu bhala materjal ta' referenza standard kemm bhala kontrolli pożittivi (Tabella 1) jew waqt l-ottimizzazzjoni tat-testijiet sabiex jiġu evitati reazzjonijiet bejniethom (Tabella 2). L-varjazzjonijiet huma disponibbli fil-kummerċ minn:

1. National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPBP), Central Science Laboratory, York, UK
2. Culture Collection of the Plant Protection Service (PD), Wageningen, the Netherlands.
3. Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP), INRA Station Phytobactériologie, Angers, France.

Skeda 1 Panel ta' referenza ta' l-izolati ta' *R.solanacearum*

Kodiċi NCPBP	SMT #	Kodiċijiet oħra	Pajjiż ta' l-orijini	Biovar
NCPBP 4153	6	CFBP 4582, Pr 3020, EURS11	L-Eġittu	2
NCPBP 4154	10	CFBP 4582, 550, EURS21	It-Turkija	2
NCPBP 3857	12	CFBP 4587, Pr 1140, EURS26	Ingilterra	2
NCPBP 1584	23	CFBP 4598, EURS49	Ċipru	2
NCPBP 2505	24	CFBP 4599, EURS50	l-Isvezja	2
NCPBP 4155	26	CFBP 4601, 502, EURS55	Il-Belġju	2
NCPBP 4156 (*)	71 (*)	PD 2762, CFBP 3857	L-Olanda	2
NCPBP 4157	66	LNPV 15.59	Franza	2
NCPBP 4158	39	CFBP 4608, Port 448, EURS80	il-Portugall	2
NCPBP 4160	69	IVIA-1632-2	Spanja	2
NCPBP 4161	76	B3B	il-Ġermanja	2
NCPBP 325	41	CFBP 2047, KEL60-1, R842	USA	1
NCPBP 3967	42	CFBP 4610, R285, GONG7	Il-Kosta Rika	1
NCPBP 4028	43	CFBP 4611, R303/571, CIP310, SEQ205	Il-Kolombja	2
NCPBP 3985	44	CFBP 4612, R578, CIP312	Il-Perù	2T
NCPBP 3989	45	CFBP 4613, R568, CIP226	Il-Brazil	2T
NCPBP 3996	46	CFBP 3928, R276/355, CIP72, SEQ225	Il-Perù	3
NCPBP 3997	47	CFBP 4614, R280/363, CIP49, HAY0131a	L-Awstralja	3
NCPBP 4029	48	CFBP 4615, R297/349, CIP121, CM1b2861	Is-Sri Lanka	4
NCPBP 4005	49	CFBP 4616, R470	Il-Filippini	4
NCPBP 4011	50	CFBP 4617, R288, HEmps2	Iċ-Ċina	5

(*) Uża bhala referenza standard il-varjazzjoni ta' *R.solanacearum* biovar 2 (razza 3).

Nota: L-awtentità tal-varjazzjonijiet ta' hawn fuq jistgħu jiġu garantiti biss jekk ġew minn kollezzjoni ta' kultivazzjoni awtentika.

Skeda 2 SMT reference panel of serologically-or genetically-related bacteria for use in optimisation of detection tests.

Kodiċi NCPPB	SMT #	Kodiċi iehor	L-identifikazzjoni
NCPPB 4162	51	CFBP 1954	<i>Bacillus polymyxa</i> ⁽¹⁾
NCPPB 4163	52	CFBP 1538	<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i> ⁽¹⁾
NCPPB 4164	—	CFBP 2227	<i>Burkholderia cepacia</i> ⁽²⁾
NCPPB 4165	—	CFBP 2459	<i>Ralstonia pickettii</i> ⁽²⁾
NCPPB 4166	58	CFBP 3567 CSL Pr1150	<i>Ralstonia pickettii</i> ⁽¹⁾
NCPPB 4167	60	CFBP 4618 PD 2778	<i>Ralstonia</i> sp. ⁽¹⁾
NCPPB 1127	53	CFBP 3575	<i>Burkholderia andropogonis</i> ⁽¹⁾
NCPPB 353	54	CFBP 3572	<i>Burkholderia caryophylli</i> ⁽¹⁾
NCPPB 945	55	CFBP 3569	<i>Burkholderia cepacia</i> ⁽¹⁾
NCPPB 3708	56	CFBP 3574	<i>Burkholderia glumae</i> ⁽¹⁾
NCPPB 3590	57	CFBP 3573	<i>Burkholderia plantarii</i> ⁽¹⁾
NCPPB 3726	59	CFBP 3568	<i>Il-batterju li jikkawża l-marda tat-tahsir tal-pjanta tal-banana</i> ⁽¹⁾ ⁽²⁾ ⁽³⁾
NCPPB 4168	61	CFBP 4619 IPO S339	<i>Enterobacter</i> sp. ⁽¹⁾
NCPPB 4169	62	IPO 1695	<i>Enterobacter</i> sp. ⁽¹⁾
NCPPB 4170	63	CFBP 4621 IPO S306	<i>Ochrobactrum anthropi</i> ⁽¹⁾ ⁽²⁾
NCPPB 4171	64	CFBP 4622 IPO 1693	<i>Curtobacterium</i> sp. ⁽¹⁾ ⁽²⁾
NCPPB 4172	65	IPO 1696a	<i>Pseudomonas</i> sp. ⁽¹⁾
NCPPB 4173	—	PD 2318	<i>Aureobacterium</i> sp. ⁽²⁾
NCPPB 4174	81	IVIA 1844.06	<i>Flavobacterium</i> sp. ⁽¹⁾ ⁽²⁾

⁽¹⁾ Varjetà ta' reazzjoni potenzjali bejniethom f'testijiet seroloġiċi (IF u/jew ELISA) b'antisjeri poliklonali.

⁽²⁾ Varjetà li minnha jista' jiġi amplifikat prodott PCR f'xi laboratorji ta' daqs simili għal dak mistenni mill-użu tal-primers speċifiċi OLI-1 u Y-2 (ara l-Appendiċi 6).

⁽³⁾ Li hu probabbli li johloq reazzjoni bejniethom f'hafna mit-testijiet iżda maghruf li jsehħ biss fil-banana ta' l-Indonesia.

(b) *Materjal ta' kontroll standardizzat kummerċjalment disponibbli*

Il-materjal ta' kontroll standard li ġej huwa disponibbli mill-kollezzjoni tal-kultivazzjoni tal-NCPPB.

Estratt tar-residwu tal-patata mnixxef bil-kesha minn tuberi ta' patata b'sahħitha bhala kontroll negattiv għat-testijiet kollha.

Estratt tar-residwu tal-patata mnixxef minn 200 tuberu ta' patata b'sahħitha li fih ċelluli 10^3 sa 10^4 u 10^4 sa 10^6 *R.solanacearum* biovar 2 (varjetà NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) bhala kontrolli pożittivi għal testijiet seroloġiċi u PCR. Peress illi l-vijabilità taċ-ċellula hija affettwata matul it-tnixxif permezz tal-kesha, dawn m'humiex adattati bhala kontrolli standard għat-testijiet ta' iżolazzjoni u l-bioassay.

Tahlit iffissat permezz tal-formalina ta' *R.solanacearum* biovar 2 (varjetà NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) f'ċelluli 10^6 għal kull ml bhala kontrolli pożittivi għal testijiet seroloġiċi.

B. Preparazzjoni ta' kontrolli pożittivi u negattivi għat-testijiet ewlenin ta' screening tal-PCR/IF u FISH

Ipproduċi kultivazzjoni ta' 48 siegħa ta' varjetà aggressiva ta' *R.solanacearum* race3/biovar2 (e.g. strain NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) fuq medju basal SMSA u hallat f'10 nM ta' buffer tal-fosfat sabiex tikseb densità taċ-ċellula ta' madwar 2×10^8 cfu għal kull ml. Dan issoltu jinkiseb permezz ta' sospensjoni li hija f'it imdardra li hija ekwivalenti għal densità ottika ta' 0.15 fi 600 nm.

Nehhi l-qalba tan-naħa ta' l-għarqub ta' 200 tuberu mehud minn produzzjoni tal-varjetà tal-ġilda bajda magħrufa li hi nieqsa minn *R.solanacearum*.

Ipproċessa t-truf ta' l-għarqub bħas-soltu u erġa' hallat ir-residwu f'10 ml.

Ipprepara 10 mikrovjali ta' 1.5ml sterili b'900 µl tar-residwu li reġa' ġie mhallat.

Ittrasferixxi 100 µl tat-tahlita ta' *R.solanacearum* lill-ewwel mikrovjal. Vortex.

Stabbilixxi livelli deċimali ta' kontaminazzjoni billi tiddilwi aktar fil-hames mikrovjali li jmiss.

Is-sitt mikrovjali kkontaminati se jkunu wżati bhala kontrolli pożittivi. L-erba' mikrovjali li mhux kontaminati se jkunu wżati bhala kontrolli negattivi. Ittikketta l-mikrovjali kif imiss.

Ipprepara alikwoti ta' 100 µl f'mikrovjali sterili ta' 1.5 ml li b'hekk tikseb 9 replikajiet ta' kull kampjun ta' kontroll. Ahżen f'temperatura ta' - 16 sa - 24 °C sakemm jintużaw.

Il-preżenza u kwantifikazzjoni ta' *R.solanacearum* fil-kampjuni ta' kontroll għandhom l-ewwel jiġu kkonfermati minn IF.

Għat-test PCR, wettaq estratt tad-DNA mill-kampjuni pożittivi u negattivi b'kull serje ta' kampjuni ta' l-ittestjar.

Għat-testijiet IF u FISH, wettaq test ta' verifikazzjoni tal-koncentrazzjoni fuq kampjuni tal-kontroll pożittivi u negattivi b'kull serje ta' kampjuni tat-test.

Għat-testijiet ta' verifikazzjoni tal-koncentrazzjoni IF, FISH u PCR, *R.solanacearum* għandu jkun osservat f'almenu 10^6 u 10^4 celluli/ml tal-kontrolli pożittivi u mhux f'kwalunkwe mill-kontrolli negattivi.

Appendici 4

Buffers għall-proċeduri tat-testijiet

ĠENERALI: *Buffers* sterilizzati li mhux miftuħa jistgħu jinħażnu sa sena

1. Buffers għall-proċedura ta' estrazzjoni**1.1. Buffer ta' estrazzjoni (50 mM phosphate buffer, pH 7.0)**

Dan il-*buffer* jintuza għall-estraxxjoni tal-batterju mit-tessuti tal-pjanti permezz ta' omoġenizzazzjoni jew tahlit.

Na ₂ HPO ₄ (<i>anhydrous</i>)	4.26 g
KH ₂ PO ₄	2.72 g
Ilma distillat	1.00 L

Iddissolvi l-ingredjenti, ċekkja l-pH u sterilizza permezz ta' l-*autoclaving* ftemperatura ta' 121 °C għal 15-il minuta.

Komponenti addizzjonali jistgħu jkunu utli kif ġej:

	Skop	Kwantità (għal kull L)
Bicċiet irqaq tal-Lubrol	Deflocculant (*)	0.5 g
DC silicone antifoam	Aġent Anti-foam (*)	1.0 ml
Tetrasodju pirofosfat	Anti-ossidant	1.0 g
Polyvinylpyrrolidone-40000 (PVP-40)	Binding ta' inibituri tal-PCR	50 g

(*) Għall-użu mal-metodu ta' estraxxjoni omoġenizzanti.

1.2. Buffer ta' residwu (10 mM phosphate buffer, pH 7.2)

Dan il-*buffer* jintuza għat-tahlita mill-ġdid u s-sustanza dilwita ta' tuberu tal-patata tal-qalba tan-naħa ta' l-arqub ta' estratti tal-patata wara l-konċentrazzjoni f'residwu permezz ta' ċentrifugazzjoni.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.70 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.4 g
Ilma distillat	1.0 L

Iddissolvi l-ingredjenti, ċekkja l-pH u sterilizza permezz ta' l-*autoclaving* ftemperatura ta' 121 °C għal 15-il minuta.

2. Buffers għat-test IF**2.1. Buffer IF (10 mM phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2)**

Dan il-*buffer* jintuza għad-dilwizzjoni ta' l-antikorpi.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.7 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.4 g
NaCl	8.0 g
Ilma distillat	1.0 L

Iddissolvi l-ingredjenti, ċekkja l-pH u sterilizza permezz ta' l-*autoclaving* ftemperatura ta' 121 °C għal 15-il minuta.

2.2. IF-buffer-Tween

Dan il-*buffer* jintuża għall-ħasil ta' pjastru.

Żid 0.1 % Tween 20 lill-*IF buffer*.

2.3. Phosphate buffered glycerol, pH 7.6

Dan il-*buffer* jintuża bhala likwidu montanti fuq l-aperturi ta' pjastru *IF* sabiex ikabbar il-fluworexxenza.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	3.20 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.15g
Glicerol	50 ml
Ilma distillat	100 ml

Tahlil montanti ta' kontra ċ-ċarar jinsab fil-kummerċ eż *Vectashield*[®] (*Vector Laboratories*) jew *Citifluor*[®] (*Leica*).

3. **Buffers għat-testijiet ELISA Indiretti**3.1. *Buffer* tal-kisi ta' sahha doppja, pH 9.6.

Na_2CO_3	6,360 g
NaHCO_3	11,720 g
Ilma distillat	1,00 l

Holl l-ingredjenti, ċċekkja l-pH u sterilizza permezz ta' l-*autoclaving* f'temperatura ta' 121 °C għal 15-il minuta.

Sodju sulfat (0.2 %) jista' jiġi miżjud bhala antiossidant jekk ikun hemm il-bżonn sabiex tiġi evitata ż-żieda ta' kompożizzjonijiet aromatiċi ossidanti.

3.2. 10X *Phosphate buffered saline (PBS)*, pH 7.4

NaCl	80.0 g
KH_2PO_4	2.0 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	29.0 g
KCl	2.0 g
Ilma distillat	1.0 L

3.3. PBS-Tween

10X PBS	100 ml
10 % Tween 20	5. ml
Ilma distillat	895 ml

3.4. *Buffer* (antikorp) li jibblokka (għandu jiġi ppreparat frisk).

10X PBS	10 ml
<i>Polyvinylpyrrolidone- 44 000</i> (PVP-44)	2.0 g
10 % Tween 20	0.5 ml
Ħalib tat-trab	0.5 g
Ilma distillat	għamel sa 100 ml

3.5. Tahlil ta' sustrat ta' fosfat alkalniku, pH 9.8

Diethanolamine	97 ml
Ilma distillat	800 ml

Hallat u aġġusta għal pH 9.8 b'HCl ikkoncentrat

Agħmel sa 1 L b'ilma distillat.

Żid 0.2 g MgCl₂

Iddissolvi 2 pilloli *phosphatase sustrate* ta' 5 mg (*Sigma*) għal kull 15-il ml ta' tahlil.

4. **Buffers għat-testijiet DASI ELISA**4.1. *Buffer* tal-kisi, pH 9.6.

Na ₂ CO ₃	1.59 g
NaHCO ₃	2.93 g
Ilma distillat	1 000 ml

iddissolvi l-ingredjenti u ċċekkja l-pH 9.6.

4.2. *10X Phosphate saline buffer*(PBS) pH 7.2-7.4

NaCl	80.0 g
NaH ₂ PO ₄ ·2 H ₂ O	4.0 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	27.0 g
Ilma distillat	1 000 ml

4.3. PBS-Tween

10X PBS	50 ml
10 % Tween 20	5 ml
Ilma distillat	950 ml

4.4. *Buffer* tas-sustrat, pH 9.8.

Diethanolamine	100 ml
Ilma distillat	900 ml

Hallat u aġġusta għal pH 9.8 b'HCl ikkoncentrat

Appendiċi 5

Determinazzjoni tal-livell ta' kontaminazzjoni fit-testijiet IF u FISH

1. Ghodd in-numru medju ta' ċelluli fluworixxenti tipiċi għal kull aspekt viżwali mikroskopiku (c)
2. Ikkalkula n-numru ta' ċelluli fluworixxenti tipiċi għal kull *slide window* ta' mikroskopju (C)

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

fejn S = l-erja tal-wiċċ ta' l-apertura ta' *multispot slide*

u s = l-erja tal-wiċċ ta' l-*objective field*

$$s = \pi^2/4G^2K^2 \quad \text{fejn} \quad i = \text{field coefficient (ivarja minn 8-24 skond it-tip okkulari)}$$

K = koefiċjent tat-tubu (1 jew 1.25)

G = tkabbir ta' l-oġġettiv (100x, 40x eċċ.)

3. Ikkalkula n-numru ta' ċelluli fluworixxenti tipiċi għal kull ml ta' residwu li reġghu ġew imhallta.

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

fejn y = volum ta' residwu li reġa' ġie mhallat fuq kull apertura

u F = fattur ta' dilwizzjoni ta' residwu li ġie mhallat mill-gdid.

Appendiċi 6

Protokollu u reagġenti tal-PCR validati

Nota: L-Ittestjar preliminari ghandu jippermetti detezzjoni reproducibbli ta' ċelluli 10^3 sa 10^4 ta' *R. solanacearum* ghal kull ml ta' estratt ta' kampjun.

L-Ittestjar preliminari ghandu wkoll juri li m'hemm l-ebda riżultati pożittivi foloz b'panel ta' varjetajiet batteriċi magħżula (ara l-Appendiċi 3).

1. Protokoll PCR ta' Seal et al.(1993)

1.1. Oligonucleotide primers

Forward primer OLI-1 5'-GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC-3'

Reverse primer Y-2 5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'

Daqs ta' l-amplikon mistenni minn *R.solanacearum* template DNA = 288 bp

1.2. Tahlita ta' reazzjoni tal-PCR

Reagġent	Kwantità ghal kull reazzjoni	Koncentrazzjoni finali
UPW Sterili	17,65 µl	
10X PCR buffer ⁽¹⁾ (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
Tahlita ta' dNTP (20mM)	0,25 µl	0,2 mM
Primer OLI-1 (20 µM)	1,25 µl	1µM
Primer Y-2 (20 µM)	1,25 µl	1µM
Taq polymerase (5U/µl) ⁽¹⁾	0,1 µl	0,5 U
Volum tal-kampjun	2,0 µl	
Volum totali:	25 µl	

⁽¹⁾ Il-metodu ġie vvalidat permezz ta' l-użu ta' polimerazi Taq minn Perkin Elmer (AmpliTaq) u Gibco BRL.

1.3. Kundizzjonijiet ta' reazzjoni tal-PCR

Haddem il-programm li ġej:

- ċiklu wiehed ta': (i) 2 minuti f'temperatura ta' 96 °C (denaturation of template DNA)
- 35 ċiklu ta': (ii) 20 minuti f'temperatura ta' 94 °C (denaturation of template DNA)
- (iii) 20 sekonda f'temperatura ta' 68 °C (annealing of primers)
- (iv) 30 sekonda f'temperatura ta' 72 °C (estensjoni tal-kopja)
- ċiklu wiehed ta': (v) 10 minuti f'temperatura ta' 72 °C (estensjoni finali)
- (vi) zomm f'temperatura ta' 4 °C

Nota: Dan il-programm ġie sfruttat għall-użu b'ċiklatur termali Perkin Elmer 9600. Modifikazzjoni tad-dewmien tal-fażijiet ta' ċikli (ii), (iii) and (iv) jistgħu jkunu mehtieġa għall-użu ma' mudelli oħra.

1.4. Analizi tar-restrizzjoni ta' l-enzimi ta' l-amplikon.

Prodotti PCR amplifikati mid-DNA *R.solanacearum* jipproduċu distinctive restriction fragment length polymorphism ma' l-enzimi *Ava II* wara inkubazzjoni f'temperatura ta' 37 °C

2. Protokoll PCR ta' Pastrik and Maiss (2000)

2.1. Oligonucleotide primers

Forward primer OLI-1 5'-agt cga acg gca gcg ggg g-3'

Reverse primer Y-2 5'-ggg gat ttc aca tcg gtc ttg ca-3'

Daqs ta' l-amplikon mistenni minn *R.solanacearum* template DNA = 553 bp

2.2. Tahlita ta' reazzjoni tal-PCR

Reaġġent	Kwantità għal kull reazzjoni	Koncentrazzjoni finali
UPW Sterili	16,025 µl	
10X PCR buffer (1)	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (fraction V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
Tahlita d-nTP (20mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer Ps-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Primer Ps-2 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Taq polymerase (5U/µl) (1)	0,1 µl	0,5 U
Volum tal-kampjun	5,0 µl	
Volum totali:	25,0 µl	

(1) Il-metodu ġie vvalidat permezz ta' l-użu ta' polimerazi Taq minn Perkin Elmer (AmpliTaq) u Gibco BRL.

Nota: Ottimizzat oriġinarjament għat-termoċiklatur MJ Research PTC 200 b'Gibco Taq Polymerase Perkin Elmer AmpliTaq u buffer jistgħu jintużaw wkoll fl-istess konċentrazzjonijiet

2.3. Kundizzjonijiet ta' reazzjoni tal-PCR

Haddem il-programm li ġej:

- ċiklu wiehed ta': (i) 5 minuti f'temperatura ta' 95 °C (denaturation of template DNA)
- 35 ċiklu ta': (ii) 30 minuti f'temperatura ta' 95 °C (denaturation of template DNA)
- (iii) 30 sekonda f'temperatura ta' 68 °C (annealing of primers)
- (iv) 45 sekonda f'temperatura ta' 72 °C (estensjoni tal-kopja)
- ċiklu wiehed ta': (v) 5 minuti f'temperatura ta' 72 °C (estensjoni finali)
- (vi) żomm f'temperatura ta' 4 °C

Nota: Dan il-programm hu ottimizzat għall-użu b'ċiklatur termali MJ Research PTC 200. Modifikazzjoni tad-dewmien tal-fażijiet taċ-ċikli (ii), (iii) u (iv) jistgħu jkunu meħtieġa għall-użu ma' mudelli oħra.

2.4. Analizi tar-restrizzjoni ta' l-enzimi ta' l-amplikon.

Prodotti PCR apmlifikati mid-DNA *R.solanacearum* jipproduċu *distinctive restriction fragment length polymorphism* ma' l-enzimi *Ava II* wara inkubazzjoni f'temperatura ta' 65 °C għal 30 minuta. Il-frammenti ta' restrizzjoni miksuba minn *R.solanacearum*-framment speċifiku huma 457 bp u 96 bp fid-daqs.

3. Protokoll Multiplex PCR b'kontroll PCR intern (Pastrik et al., 2002)

3.1. Oligonucleotide primers

Forward primer RS-1-F 5'-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3'

Reverse primer RS-1-R 5'-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3'

Forward primer NS-5-F 5'-AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G-3'

Reverse primer NS-6-R 5'-GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC-3'

Daqs amplikon mistenni minn mudell ta' *R.solanacearum* DNA = 718 bp (sett ta' primer RS)

Daqs amplikon mistenni mill-kontroll PCR intern 18S rRNA = 310 bp (sett ta' primer NS)

3.2. Tahlita ta' reazzjoni tal-PCR

Reaġġent	Kwantità għal kull reazzjoni	Koncentrazzjoni finali
UPW Sterili	12,625 µl	
10X PCR buffer ⁽¹⁾ (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (fraction V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
Tahlita d-nTP (20mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer RS-1-F (10µM)	2,0 µl	0,8 µM
Primer RS-1-R (10µM)	2,0 µl	0,8 µM
Primer NS-5-F (10µM) ⁽²⁾	0,15 µl	0,06 µM
Primer NS-6-R (10µM) ⁽²⁾	0,15 µl	0,06 µM
Taq polymerase (5U/µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1,0 U
Volum tal-kampjun	5,0 µl	
Volum totali:	25,0 µl	

⁽¹⁾ Il-metodu ġie vvalidat permezz ta' l-użu ta' polimerazi Taq minn Perkin Elmer (AmpliAq) u Gibco BRL.

⁽²⁾ Koncentrazzjoni ta' primers NS-5-F u NS-6-R kienu ottimizzati għall-estratt tal-qalba tan-naħa ta' l-arqub tal-patata permezz tal-metodu omoġenizzanti u l-purifikazzjoni tad-DNA skond Pastrik (2000) (ara Sezzjoni VI.A.6.1.a.). L-ottimizzazzjoni mill-ġdid ta' koncentrazzjonijiet ta' reaġġenti se jkunu meħtieġa jekk estrazzjoni permezz ta' tahlit jew metodi oħra ta' iżolazzjoni tad-DNA huma wżati.

3.3. Kundizzjonijiet ta' reazzjoni tal-PCR

Haddem il-programm li ġej:

- ċiklu wiehed ta': (i) 5 minuti f'temperatura ta' 95 °C (denaturation of template DNA)
- 35 ċiklu ta': (ii) 30 sekonda f'temperatura ta' 95 °C (denaturation of template DNA)
- (iii) 30 sekonda f'temperatura ta' 58 °C (annealing of primers)
- (iv) 45 sekonda f'temperatura ta' 72 °C (estensjoni tal-kopja)
- ċiklu wiehed ta': (v) 5 minuti f'temperatura ta' 72 °C (estensjoni finali)
- (vi) żomm f'temperatura ta' 4 °C

Nota: Dan il-programm hu ottimizzat għall-użu b'ċiklatur termali MJ Research PTC 200. Modifikazzjoni tad-dewmien tal-fażijiet ta' ċikli (ii), (iii) and (iv) jistgħu jkunu meħtieġa għall-użu ma' mudelli oħra.

3.4. Analizi tar-restrizzjoni ta' l-enzimi ta' l-amplikon.

Prodotti PCR amplifikati mid-DNA *R.solanacearum* jipproduċu *distinctive restriction fragment length polymorphism* ma' l-enzimi *Bsm I* jew *Isoschizomere* (e.g. *Mva I* 269 I) wara inkubazzjoni f'temperatura ta' 65 °C għal 30 minuta.

4. Protokoll PCR biovar-specifiku ta' *R.solanacearum* (Pastrik et al, 2001)

4.1. Oligonucleotide primers

Forward primer RS-1-F 5'-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3'

Reverse primer Rs-1-R 5'-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3'

Reverse primer Rs-3-R 5'-TTC ACG GCA AGA TCG CTC-3'

Daqs amplikon mistenni minn *R.solanacearum* template DNA:

b'Rs-1-F/Rs-1-R = 718 bp

b'Rs-1-F/Rs-3-R = 716 bp

4.2. Tahlita ta' reazzjoni tal-PCR

(a) *Biovar 1/2*-speċifiku PCR

Reaġġent	Kwantità għal kull reazzjoni	Konċentrazzjoni finali
UPW Sterili	12,925 µl	
10X PCR buffer ⁽¹⁾	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (frazzjoni V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
Tahlita ta' d-NTP (20mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer Rs-1-F (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Primer Rs-1-R (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Taq polymerase (5U/µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1 U
Volum tal-kampjun	5,0 µl	
Volum totali:	25,0 µl	

⁽¹⁾ Il-metodu ġie vvalidat permezz ta' l-użu ta' polimerazi Taq minn Perkin Elmer (AmpliTaq) u Gibco BRL.

(b) *Biovar 3/4*-speċifiku PCR

Reaġġent	Kwantità għal kull reazzjoni	Konċentrazzjoni finali
UPW Sterili	14,925 µl	
10X PCR buffer ⁽¹⁾	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (fraction V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
Tahlita ta' dNTP (20mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer Rs-1-F (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Primer Rs-3-R (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Taq polymerase (5U/µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1 U
Volum tal-kampjun	5,0 µl	
Volum totali:	25,0 µl	

⁽¹⁾ Il-metodu ġie vvalidat permezz ta' l-użu ta' polimerazi Taq minn Perkin Elmer (AmpliTaq) u Gibco BRL.

4.3. Kundizzjonijiet ta' reazzjoni tal-PCR

Haddem dan il-programm li ġej kemm għal *biovar 1/2*-u għal *biovar 3/4/5*-reazzjonijiet speċifiċi:

- ċiklu wiehed ta': (i) 5 minuti f'temperatura ta' 95 °C (denaturation of template DNA)
- 35 ċiklu ta': (ii) 30 sekonda f'temperatura ta' 95 °C (denaturation of template DNA)
- (iii) 30 sekonda f'temperatura ta' 58 °C (annealing of primers)
- (iv) 45 sekonda f'temperatura ta' 72 °C (estensjoni tal-kopja)
- ċiklu wiehed ta': (v) 5 minuti f'temperatura ta' 72 °C (estensjoni finali)
- (vi) żomm f'temperatura ta' 4 °C

Nota: Dan il-programm hu ottimizzat għall-użu b'ċiklatur termali MJ Research PTC 200. Modifikazzjoni tad-dewmien tal-fażijiet taċ-ċikli (ii), (iii) and (iv) jistgħu jkunu meħtieġa għall-użu ma' mudelli oħra.

4.4. Analizi tar-restrizzjoni ta' l-enzimi ta' l-amplikon.

Prodotti PCR amplifikati mid-DNA *R.solanacearum* permezz ta' l-użu ta' primers Rs-1-F u Rs-1-R jipproduċu *distinctive restriction fragment length polymorphism* ma' l-enzimi Bsm I jew Isoschizomere (e.g. Mva 1269 I) wara inkubazzjoni f'temperatura ta' 65 °C għal 30 minuta. Prodotti PCR amplifikati mid-DNA *R.solanacearum* permezz ta' l-użu ta' Rs-1-F u Rs-3-R m'għandhomx siti ta' restrizzjoni.

5. Preparazzjoni tal-Loading buffer**5.1. Bromphenol blue (10 %-stock solution)**

Bromphenol blue	5 g
Ilma distillat (<i>bideest</i>)	50 ml

5.2. Loading buffer

Glicerol (86 %)	3,5 ml
<i>Bromphenol blue</i> (5,1)	300 µl
Ilma distillat (<i>bideest</i>)	6,2 ml

6. 10X Tris Acetate EDTA (TAE) buffer, pH 8.0

Tris buffer	48,40 g
Aċtu aċetiku glaċjali	11,42 ml
EDTA (<i>disodium salt</i>)	3,72 g
Ilma distillat	1,00 l

Iddilwi għal 1X qabel l-użu.

Jinsab ukoll fil-kummerċ (eż. *Invitrogen* jew ekwivalenti).

Appendiċi 7

Reaġenti validati għat-test FISH

1. Oligo-sondi

R.solanacearum-specifika OLI-1-CY3: 5'-ggc agg tag caa gct acc ccc-3'

Sonda Ewbatterika EUB-338-FITC li mhux specifiku: 5'-gct tcc cgt agg agt-3'

2. Tahlil fissattiv

[TWISSIJA! IL FISSATTIV FIH PARAFORMALDEHYDE LI HUWA TOSSIKU ILBES L-INGWANTI U TIHUX NIFS 'IL ĠEWWA U HUWA RRIKKMANDAT LI WIEĦED JAĦDEM ĠEWWA FUME CUPBOARD]

- (i) Sahħan 9 ml ta' ilma ta' grad mollekulari (eż ilma pur (UPW)) għal xi 60 °C u żid 0.4 g *paraformaldehyde*. Il-*Paraformaldehyde* jiddissolvi ruħu wara li żżid 5 qatriet ta' 1N NaOH u wara li thawwat b'ogġett manjetiku li jiddawwar.
- (ii) Irranġa l-pH sa 7.0 billi żżid 0.1 M buffer tal-fosfat (PB; pH 7.0 u 5 qatriet ta' HCl 1N. Iċċekkja l-pH permezz ta' strippi ta' indikazzjoni u aġġusta, jekk ikun hemm bżonn b'HCl jew NaOH. [TWISSIJA! TUŻAX METRU PH FTAHLIL LI FIHOM PARAFORMALEDHYDE]
- (iii) Iffiltra t-tahlil minn go *membrane filter* ta' 0.22 µm u zomm nieqes mit-trab f'temperatura ta' 4 °C sakemm jerġa' jintuża.

3. 3X Hybmix

NaCl	2.7 M
Tris-HCl	60 mM (pH 7.4)
EDTA (sterilizzat bil-filter u <i>autoclaved</i>)	15 mM

Iddilwi sa 1X kif meħtieġ.

4. Tahlil ta' Ibridizzazzjoni

1X Hybmix

<i>Sodium dodecyl sulphate</i> (SDS)	0.01 %
Formamide	30 %
sonda EUB 338	5 ng/µl
sonda OLI-1 or OLI-2	5 ng/µl

Ipprepara kwantitajiet ta' soluzzjonijiet ta' l-ibridizzazzjoni skond il-kalkoli tat-Tabella 1. Għal kull pjastra (li fiha dupli-kati ta' żewġ kampjuni differenti) 90 µl ta' soluzzjonijiet ta' l-ibridizzazzjoni huma meħtieġa. PERESS ILLI L- FORMA-DIDE HUWA TOSSIKU HAFNA ILBES INGWANTI U HU L-PREKAWZJONIJET TA' SIGURTÀ MEHTIEĠA!

Skeda 1 Kwantitajiet sugġeriti għall-preparazzjoni tat-tahlita ta' ibridizzazzjoni

Numru ta' pjastr:	1	4	6	8	10
UPW Sterili	23.1	92.4	138.6	184.8	231.0
3x hybmix	30.0	120.0	180.0	240.0	300.0
1 % SDS	0.9	3.6	5.4	7.2	9.0
Formamide	27.0	108.0	162.0	216.0	270.0
EUB 338 (100 ng/µl)	4.5	18.0	27.0	36.0	45.0
Sonda OLI-1 jew OLI-2 (100 ng/µl)	4.5	18.0	27.0	36.0	45.0
Volum totali (µl)	90.0	360.0	540.0	720.0	900.0

Nota: Ahzen kull solution li fiha oligo-sondi sensitivi għad-dawl fid-dlam f'temperatura ta' -20 °C. Ipproteġi kontra d-dawl tax-xemx dirett jew dawl ta' l-elettriku waqt l-użu.

5. 0.1M Phosphate buffer, pH 7.0

Na ₂ HPO ₄	8.52 g
KH ₂ PO ₄	5.44 g
Ilma distillat	1.00 L

Iddissolvi l-ingredjenti, ċekkja l-pH u sterilizza permezz ta' l-*autoclaving* f'temperatura ta' 121 °C għal 15-il minuta.

Appendiċi 8

L-kultivazzjoni tal-brunġiel u tadam

Iżra' żrieragh tat-tadam (*Lycopersicon esculentum*) jew brunġiel (*Solanum melongena*) f'kompost taż-żerriegħa ppastorizzata. Aqla' n-nebbieta minn postha u hawwilha post ieħor permezz ta' *fully expanded cotyledons* (10 sa 14-il ġurnata) f'kompost tal-qasari pastorizzat.

Brunġiel jew tadam għandhom jtkabbru f'serra bil-kundizzjonijiet ambjentali li ġejjin qabel ma jitlaqqmu:

Tul tal-ġurnata:	14-il siegħa jew, jekk itwal, tul naturali tal-ġurnata;
Temperatura:	ġurnata: 21 sa 24 °C, lejl: 14 sa 18 °C,
Varjetà suxxettibbli ta' tadam:	'Moneymaker'
Varjetà suxxettibbli ta' brunġiel:	'Black Beauty'
Fornituri:	ara l-portal http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

REFERENZI

1. Amann, R.I., L. Krumholz and D.A. Stahl. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172: 762-770.
2. Anon. 1998. Council Directive 98/57/EC of 20 July 1998 on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* Official Journal of the European Communities L235, 1-39.
3. Boudazin, G., A.C. Le Roux, K. Josi, P. Labarre and B. Jouan. 1999. Design of division specific primers of *Ralstonia solanacearum* and application to the identification of European isolates. *European Journal of Plant Pathology* 105: 373-380.
4. Caruso, P., Gorris, M.T., Cambra, M., Palomo, J.L., Collar, J and Lopez, M.M. 2002. Enrichment Double-Antibody Sandwich Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay That Uses a Specific Monoclonal Antibody for sensitive Detection of *Ralstonia solanacearum* in Asymptomatic Potato Tubers. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3634-3638.
5. Cook, D., Barlow, E. and Sequeira, L. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 1:113-121.
6. Elphinstone, J.G., Hennessy, J., Wilson, J.K. and Stead, D.E. 1996. Sensitivity of detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. *EPPO Bulletin* 26; 663-678.
7. Englebrecht, M.C. (1994) Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. In: A.C. Hayward (ed.) *Bacterial Wilt Newsletter* 10, 3-5. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.
8. Hayward, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 27; 265-277.
9. Hayward, A.C., El-Nashaar, H.M., Nydegger, U. and De Lindo, L. 1990. Variation in nitrate metabolism in biovars of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 69; 269-280.
10. Ito, S., Y. Ushijima, T. Fujii, S. Tanaka, M. Kameya-Iwaki, S. Yoshiwara and F. Kishi. 1998. Detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in soil using a semi-selective medium and a PCR technique. *J. Phytopathology* 146; 379-384.
11. Janse, J.D. (1988) A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 18, 343-351.
12. Janse, J.D. 1991. Infra- and intra-specific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty-acid analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 14; 335-345.
13. Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44; 693-695.
14. Klement Z.; Rudolph, K and D.C. Sands, 1990. *Methods in Phytobacteriology*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 pp.
15. Lelliott, R.A. and Stead, D.E. 1987. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. Blackwell scientific Publications Ltd., Oxford. 216 pp.
16. Lopez, M.M., Gorris, M.T., Llop, P., Cubero, J., Vicedo, B., Cambra, M., 1997. Selective enrichment improves selective isolation, serological and molecular detection of plant pathogenic bacteria. In: H.W. Dehne *et al.*, (eds). Kluwer Academic Publishers. pp. 117-121.
17. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J., 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2286-2295.
18. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85; 528-536.
19. Opina, N., F. Tavner, G. Holloway, J.-F. Wang, T.-H. Li, R. Maghirang, M. Fegan, A.C. Hayward, V. Krishnapillai, W.F. Hong, B.W. Holloway, J.N. Timmis. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *As Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 5; 19-33.
20. Pstrik, K.H. and Maiss, E. 2000. Detection of *R. solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. *J. Phytopathology* 148; 619-626.
21. Pstrik, K.H., Elphinstone, J.G. and Pukall, R. 2002. Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification of 16S-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control. *European Journal of Plant Pathology* 108, 831-842.
22. Robinson-Smith, A., Jones, P., Elphinstone, J.G. and Forde, S.M.D. (1995) Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. *Food and Agricultural Immunology* 7, 67-79.

23. Schaad, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Schaad [Hrsg.]. - 3. ed.; St. Paul, Minnesota: 373 pp.
 24. Seal, S.E., L.A. Jackson, J.P.W. Young, and M.J. Daniels. 1993. Detection of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. J. Gen. Microbiol. 139: 1587-1594.
 25. Smith, J.J., Offord, L.C., Holderness, M. and Saddler, G.S. 1995. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. Applied and Environmental Microbiology 61; 4262-4268.
 26. Stead, D.E. 1992. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty-acid profiles. International Journal of Systematic Bacteriology 42; 281-295.
 27. Taghavi, M., Hayward, A.C., Sly, L.I., Fegan, M. 1996. Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. International Journal of Systematic Bacteriology 46; 10-15.
 28. Van Der Wolf, J.M., Bonants, P.J.M., Smith, J.J., Hagenaar, M., Nijhuis, E., Van Beckhoven, J.R.C., Saddler, G.S., Trigallet, A., Feuillade, R. 1998. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* Race 3 in Western Europe as determined by AFLP, RC-PFGE and rep-PCR. In: Prior, P., Allen, C. and Elphinstone, J. (eds.) Bacterial wilt disease: Molecular and Ecological Aspects. Springer (Berlin) pp. 44-49.
 29. Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N., Stead, D.E. and Boonham, N. 1999. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains using an automated and quantitative fluorescent 5' nuclease TaqMan assay. Applied and Environmental Microbiology 66; 2853-2858.
 30. Wullings, B.A., A.R. van Beuningen, J.D. Janse and A.D.L. Akkermans. 1998. Detection of *R. solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent in situ hybridization with 23s rRNA-targeted probes. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4546-4554.
-

ANNEX III

1. Għal kull okkorrenza suspettata li għaliha riżultat pożittiv fit-test(ijiet) ta' skrining ġie identifikat skond, għall-materjal tal-pjanti mniżżel u għall-każijiet l-oħra kollha, il-metodi rilevanti li jinsabu fl-Anness II, u l-konfermazzjoni jew konfutazzjoni permezz tat-tlestija ta' dawn il-metodi hi mistennija, għandu jkun hemm żamma u konservazzjoni xierqa ta':
 - t-tuberi kollha ta' kampjun u, kull meta hu possibbli, il-pjanti kollha ta' kampjun,
 - kwalunkwe estratt li fadal u materjal addizzjonali ppreparat għat-testijiet ta' skrining eż pjastru immunofluwor-
exxenti, u
id-dokumentazzjoni rilevanti kollha,
 - sat-tlestija ta' dawn il-metodi.Żamma tat-tuberi se tagħti s-setgħa li jsiru ttestjar ta' varjetà fejn hu possibbili.
2. Fil-każ ta' konfermazzjoni pożittiva ta' l-organizmu, għandu jkun hemm żamma u konservazzjoni xierqa ta':
 - il-materjal speċifikat fil-paragrafu 1,
u
 - kampjun tal-materjal tat-tadam jew brunġiel infettat li huwa innokulat bl-estratt tat-tuberu jew tal-pjanta, fejn
huwa xieraq,
u
 - il-kultura iżolata ta' l-organizmu sa mhux iktar minn xahar wara l-proċedura tan-notifikazzjoni skond
l-Artikolu 5(2).

ANNEX IV

L-elementi fl-investigazzjoni msemmija fl-Artikolu 5(1)(a)(i) fejn hu rilevanti se jinkludi:

- (i) postijiet tal-produzzjoni,
- patata li qed tikber jew kibret, li hi relatata klonalment ma' patata misjuba infettata bl-organizmu, li qed tikber jew li tkabbret,
 - tadam li qed jikber jew li tkabbar li huwa mill-itess sors bhat-tadam misjub infettat mill-organizmu,
 - patata jew tadam li qed jikbru jew li tkabbru u li tpoġġew taht kontroll uffiċjali minhabba fl-okkorrenza sospetta ta' l-organizmu,
 - patata li qed tikber jew li tkabbret, li hija mkabbra bl-istess mod bhal patata li tkabbret f'postijiet ta' produzzjoni misjuba infettata bl-organizmu,
 - it-tkabbir ta' patata jew tadam u llokalizzati fl-inhawi ta' postijiet ta' produzzjoni infettati, inklużi dawk il-postijiet ta' produzzjoni li jaqsmu t-tagħmir u l-facilitajiet tal-produzzjoni direttament jew permezz ta' kuntrattur komuni,
 - l-użu ta' ilma tal-wiċċ għall-irrigazzjoni jew traxxix minn kwalunkwe sors kontaminat jew suspettat li hu kkontaminat bl-organizmu,
 - bl-użu ta' ilma tal-wiċċ għall-irrigazzjoni jew traxxix minn sors użat in komuni ma' postijiet ta' produzzjoni infestat jew suspettat li hu infestat bl-organizmu,
 - mġharraq jew li gie mġharraq b'ilma tal-wiċċ ikkontaminat jew suspettat li hu kkontaminat bl-organizmu;
- u
- (ii) ilma tal-wiċċ użat għall-irrigazzjoni jew traxxix ta', jew li għharraq għalqa jew għelieqi jew post(ijiet) ta' produzzjoni kkonfermat(i) li huwa(huma) infestat(i) bl-organizmu.
-

ANNEX V

1. L-elementi li għandhom jiġu kkunsidrati fid-determinazzjoni tal-miżura ta' kontaminazzjoni probabbli taht l-Artikolu 5(1)(c)(iii), għandhom jinkludu:
 - il-materjal tal-pjanti elenkat mkabbra fpost tal-produzzjoni speċifikat bhala kontaminat taht l-Artikolu 5(1)(a)(ii),
 - post(ijiet) tal-produzzjoni jew postijiet tal-ħażna b'xi konnessjoni tal-produzzjoni mal-lista ta' materjal tal-pjanti speċifikat bhala kontaminat taht l-Artikolu 5(1)(a)(ii), inkluż dawk li jaqsmu t-tagħmir tal-produzzjoni u faċilitajiet direttament jew permezz ta' kuntrattur komuni,
 - il-materjal tal-pjanti elenkat prodotti fil-post(ijiet) tal-produzzjoni msemmija fl-inċiż ta' qabel, jew li jinsab f'dawn il-post(ijiet) tal-produzzjoni matul il-perjodu meta l-materjal tal-pjanti elenkat speċifikat bhala kontaminat taht l-Artikolu 5(1)(a)(ii), kien preżenti fil-post tal-produzzjoni msemmija fl-ewwel inċiż,
 - postijiet li jimmanipoloaw il-materjal tal-pjanti elenkat mill-postijiet tal-produzzjoni li jissemew fl-inċiżi hawn fuq;
 - kwalunkwe makkinarju, vettura, bastiment, maħżen, jew unitajiet tagħhom, u kwalunkwe oġġett ieħor inkluż materjal għall-ippakkjar, li setgħa ġie f'kuntatt mal-materjal tal-pjanti elenkat speċifikat bhala kontaminat taht l-Artikolu 5(1)(a)(ii),
 - kwalunkwe materjal tal-pjanti elenkat maħżun fi, jew f'kuntatt ma', kwalunkwe mill-istrutturi jew oġġetti elenkati fl-inċiż ta' qabel, qabel it-tindif u d-disinfazzjoni ta' strutturi u oġġetti bhal dawn,
 - bhala riżultat ta' l-investigazzjoni u l-ittestjar taht l-Artikolu 5(1)(a)(i), fil-każ tal-patata, dawk it-tuberi jew pjanti b'relazżjoni ta' klonagg ta' aħwa jew ta' ġenituri lejn, u fil-każ tat-tadam, dawk il-pjanti bl-istess sors bhall-materjal tal-pjanti elenkat speċifikat bhala kontaminat taht l-Artikolu 5(1)(a)(ii) u li għal dan, għalkemm setgħu ttestjaw negattiv għall-organizmu, jidher li kontaminazzjoni hija probabbli minn konnessjoni ta' klonagg. Ittestjar tal-varjetà tista' ssir sabiex tiġi vverifikata l-identità tat-tuberi jew pjanti kontaminati, u
 - post(ijiet) tal-produzzjoni tal-materjal tal-pjanti elenkat imsemmi fl-inċiż ta' qabel,
 - post(ijiet) tal-produzzjoni tal-materjal tal-pjanti elenkat permezz ta' l-użu ta' l-ilma għall-irrigazzjoni jew għat-traxxix li ġie speċifikat taht l-Artikolu 5(1)(c)(ii),
 - materjali ta' pjanti elenkati f'għelieqi li huma mgħarrqa bl-ilma tal-wiċċ ikkonfermat li huwa kkontaminat.
2. L-elementi li għandhom jiġu kkunsidrati fid-determinazzjoni tal-firxa possibbli taht l-Artikolu 5(1)(c)(iii), għandhom jinkludu:
 - (i) f'każijiet taht l-Artikolu 5(1)(a)(iv),
 - il-vicinanza ta' postijiet oħra tal-produzzjoni li jkabbru l-materjal tal-pjanti elenkat,
 - il-produzzjoni u l-użu komuni ta' stokkijiet taż-żerriegħa tal-patata,
 - postijiet tal-produzzjoni li jużaw ilma tal-wiċċ għall-irrigazzjoni u t-traxxix tal-materjal tal-pjanti elenkat f'każijiet fejn hemm jew kien hemm riskju ta' *run-off* ta' l-ilma tal-wiċċ minn, jew ta' għarqa ta', post(ijiet) tal-produzzjoni speċifikat(i) bhala kontaminat(i) taht l-Artikolu 5(1)(a)(ii).

- (ii) f'kazijiet fejn l-ilma tal-wiċċ għe speċifikat bhala kontaminat taht l-Artikolu 5(1)(c)(ii):
- post(ijiet) tal-produzzjoni li jipproduċi(jipproduċu) materjal tal-pjanti elenkat maġenb, jew friskju ta' għarqa minn, l-ilma tal-wiċċ speċifikat bhala kontaminat,
 - kwalunkwe baċir ta' l-irrigazzjoni diskret assoċjat ma' l-ilma tal-wiċċ speċifikat bhala kontaminat,
 - partijiet ta' l-ilma f'kuntatt ma' l-ilma tal-wiċċ speċifikat bhala kontaminat, meta tikkunsidra:
 - id-direzzjoni u r-rata tal-fluss ta' l-ilma speċifikat bhala kontaminat,
 - il-preżenza ta' pjanti ta' provenjenza, slavaġ tal-familja *Solanaceae*.

3. In-notifika msemmija fl-ewwel subparagrafu ta' l-Artikolu 5(2) għandha tkun ipprovduta kif ġej:

- immedjatament wara l-konferma tal-preżenza ta' l-organizu permezz ta' ttestjar mil-laboratorju, permezz ta' l-użu tal-metodi msemmija fl-Anness II, almenu:
 - għall-patata,
 - (a) l-isem tal-varjetà tal-lott,
 - (b) il-varjazzjoni (tip, żerriegħa, eċċ) u fejn hu applikabbli l-kategorija taż-żerriegħa,
 - għall-pjanti tat-tadam, l-isem tal-varjetà tal-lott u, fejn hu applikabbli, il-kategorija.
- bla preġudizzju għall-kundizzjonijiet għan-notifika ta' okkorrenza suspettata fl-Artikolu 4,(3), l-Istat Membru li fih l-okkorrenza għet ikkonfermata għandu, fejn ikun hemm riskju ta' kontaminazzjoni ta' materjal tal-pjanti elenkat minn jew għal ġewwa Stat(i) Membru(Membri) iehor(oħra), jgħarraf immedjatament l-Istat(i) Membru(Membri) kkonċernat(i) b'informazzjoni neċessarja sabiex ikun(u) konformi għall-Artikolu 5.3, bhal:
 - (a) l-isem tal-varjetà tal-lott tal-patata,
 - (b) l-isem u l-indirizz ta' dak li għamel il-kunsinja u tad-destinarju,
 - (c) id-data tal-kunsinja tal-lott tal-patata jew tat-tadam,
 - (d) id-daqs tal-lott tal-patata jew tadam mqassma,
 - (e) kopja tal-passaport tal-pjanta jew almenu n-numru tal-passaport tal-pjanta fejn hu neċessarju u n-numru ta' reġistrazzjoni tal-koltivatur jew tal-venditur u kopja ta' l-avviz tal-kunsinja fejn hu neċessarju.

Il-Kummissjoni se tkun mgħarrfa immedjatament meta din l-informazzjoni tkun għet ipprovduta.

4. Id-dettalji tan-notifika addizzjonali msemmija fl-ewwel subparagrafu ta' l-Artikolu 5(2) għandhom ikunu pprovduti kif ġej:

Wara l-finalizzazzjoni ta' l-investigazzjonijiet kollha, għal kull kaz:

- (a) id-data li fiha kienet għet notifikata l-kontaminazzjoni,
- (b) deskrizzjoni fil-qosor ta' l-investigazzjoni li saret għall-identifikazzjoni tas-sorsi u t-tixrid possibbli tal-kontaminazzjoni, inklużi l-livelli ta' kampjunar li saru,
- (c) informazzjoni dwar is-sors(i) tal-kontaminazzjoni identifikat(i) jew preżunt(i),
- (d) dettalji tal-miżura tal-kontaminazzjoni speċifikata, inkluż in-numru ta' postijiet tal-produzzjoni u għall-patata, in-numru ta' lotts b'indikazzjoni tal-varjetà u, jekk żerriegħa tal-patata, il-kategorija,

- (e) dettalji tad-demarkazzjoni taż-żona, inkluż in-numru ta' postijiet tal-produzzjoni, li mhumiex speċifikati bhala kontaminati, iżda inkluzi fiż-żona,
 - (f) dettalji ta' l-ispeċifikazzjoni ta' l-ilma, inkluż l-isem u l-lokalità ta' l-organizmu ta' l-ilma u l-miżura tal-projbizzjoni fuq l-ispeċifikazzjoni/irrigazzjoni,
 - (g) għal kwalunkwe kunsinja ta' pjanta tat-tadam jew lott speċifikat bhala kontaminat, iċ-ċertifikati preskritti fl-Artikolu 13(1) ii tad-Direttiva 2000/29/KE u n-numru tal-passaport, skond l-elenku fl-Anness V, Parti A, Sezzjoni I.2.2 tad-Direttiva 2000/29/KE,
 - (h) informazzjoni ohra relatata mat-tifqigha kkonfermata kif jista' jiġi rikjest mill-Kummissjoni.
-

ANNEX VI

1. Id-dispożizzjonijiet li jissemmew fl-Artikolu 6(1) għandhom:

- użu bħala għalf ta' l-annimali wara trattament bis-shana b'mod li ma jkun hemm l-ebda riskju li l-organizmu jibqa' jgħix,

jew

- jintremew f'sit apposta uffiċjali dedikat għal hekk fejn ma hemm ebda riskju identifikabbli ta' harbien ta' l-organizmu fl-ambjent eż permezz ta' nixxa fl-art agrikola jew kuntatt ma' eghjun ta' l-ilma li jistgħu jintużaw għall-irigazzjoni ta' l-art agrikola,

jew

- inċinerazzjoni,

jew

- proċessar industrijali permezz ta' tqassim dirett u immedjat lill-impjant ta' pproċessar b'faċilitajiet ta' rimi ta' skart approvat li għalih ġie stabbilit li m'hemm l-ebda riskju identifikat li l-organizmu jista' jinfirex, u b'sistema ta' tindif u disifezzjoni ta' mill-anqas il-vetturi li jtilqu mis-sit,

jew

- miżuri oħrajn, bil-kondizzjoni li ġie stabbilit li ma hemm ebda riskju identifikabbli għat-tixrid ta' l-organizmu dawn il-miżuri l-ġustifikazzjoni tagħhom għandhom jiġu nnotifikati lill-Kummissjoni u lill-Istati Membri l-oħrajn.

Xi skart li jibqa' assoċjat ma' u riżultat ta' l-għażliet hawn fuq għandu jintrema b'metodi li huma uffiċjalment approvati skond l-Anness VII ta' din id-Direttiva.

2. L-użu jew rimi tal-materjal tal-pjanti elenkat imsemmi fl-Artikolu 6(2), taht il-kontroll tal-korpi uffiċjali responsabbli ta' l-Istat(i) Membru(Membri) kkonċernat(i), b'komunikazzjoni xierqa bejn korpi uffiċjali responsabbli biex jassiguraw kontroll bħal dan f'kull hin u approvazzjoni mill-korpi uffiċjali responsabbli ta' l-Istat Membru fejn il-patata għandha tkunu ppakkjata jew ipproċessata fil-każ tal-faċilitajiet ta' rimi ta' l-iskart imsemmija fl-ewwel u t-tieni inċiż, ser ikun:

(i) għal tuberi tal-patata,

- użu bħala patata ta' varjazzjoni (*ware potato*) intiża għall-konsum, ippakkjata lesta għat-tqassim dirett u uża mingħajr ippakkjar mill-ġdid, f'sit b'faċilitajiet ta' rimi ta' l-iskart apposta. Patata intiża għat-thawwil tista' tiġi mmanigġjata biss fl-istess sit, jekk dan isir separatament jew wara t-tindif u d-disinfettar,

jew

- użu bħala patata ta' varjazzjoni intiża għall-ipproċessar industrijali, u intiża għat-tqassim dirett u immedjat lill-impjant ta' pproċessar b'faċilitajiet ta' rimi ta' l-iskart xieraq u sistema ta' tindif u diżinfettar ta' mill-anqas il-vetturi li jtilqu mis-sit,

jew

- użu jew rimi iehor, bil-kundizzjoni li jkun stabbilit li m'hemmx riskju identifikabbli li l-organizmu jinfirex u suġġett għall-approvazzjoni minn dawn il-korpi uffiċjali responsabbli.

(ii) għal partijiet oħra ta' pjanti inkluż *debris* magħmul minn zkuk u weraq,

- distruzzjoni,

jew

- użi jew rimi iehor, bil-kundizzjoni li ġie stabbilit li ma hemm ebda riskju identifikabbli għat-tixrid ta' l-organizmu u li huma soġġetti għall-approvazzjoni mill-korpi responsabbli.

3. Il-metodi xierqa għad-dekontaminazzjoni ta' l-oġġetti msemmija fl-Artikolu 6(3) għandhom ikunu t-tindif u, fejn hu xieraq, disinfezzjoni, b'mod li ma jkun hemm l-ebda riskju li l-organizmu jinfirex u għandhom jinhadmu taht is-sorveljanza tal-korpi uffiċjali responsabbli ta' l-Istati Membri.
4. Is-serje ta' miżuri li għandhom jiġu implimentati mill-Istati Membri fiż-zona (żoni) demarkata (demarkati) stabbiliti taht l-Artikolu 5(1)(a)(iv) u (c)(iii) u msemmija fl-Artikolu 6(4) għandhom jinkludu:
- 4.1. f'kazijiet fejn postijiet tal-produzzjoni ġew speċifikati bhala kontaminati taht l-Artikolu 5(1)(a)(ii):
- (a) f'għalqa jew unità ta' produzzjoni ta' prodott tar-raba' protett speċifikat bhala kontaminat taht l-Artikolu 5(1)(a)(ii), jew
- (i) matul għall-inqas l-erba' snin ta' żvilupp wara l-kontaminazzjoni speċifikata,
- miżuri għandhom jittiehdu sabiex jiġu eliminati pjanti tal-patata u tadam volontarji kif ukoll pjanti oħra ta' provenjenza ta' l-organizmu inkluż haxix hażin li jappartjeni għall-familja ta' pjanti *Solanaceae*,
 - u
 - dawn li ġejjin m'għandhomx jiġu miżrugħa:
 - tuberi ta' patata, pjanti jew żrieragħ,
 - pjanti u żerriegħ tat-tadam,
 - meta tikkunsidra l-bijologija ta' l-organizmu,
 - pjanti ta' provenjenza oħrajn,
 - pjanti ta' l-ispeċji *Brassica*, li għalihom hemm riskju identifikat li l-organizmu jibqa' jgħix.
 - prodotti tar-raba' li għalihom hemm riskju identifikat li l-organizmu jinfirex;
 - fl-ewwel staġun ta' hiddma tal-patata jew tadam wara l-perjodu speċifikat fl-inċiż ta' qabel, u b'kundizzjoni li l-għalqa instabet libera minn patata voluntiera u pjanti tat-tadam u pjanti ta' provenjenza oħra inkluż haxix hażin li jappartjeni lill-familja ta' pjanti *Solanaceae* waqt spezzjonijiet għal mill-anqas is-sentejn ta' tkabbir konsekuttivi qabel it-thawwil,
 - fil-każ tal-patata, tista' ssir biss il-produzzjoni tal-varjazzjoni tal-patata,
 - fil-każ tal-patata u t-tadam, it-tuberi tal-patata, jew il-pjanti tat-tadam maħsuda, kif inhu l-każ, għandhom jiġu ttestjati skond il-proċedura mfissra fl-Anness II
 - Fl-istaġun ta' tkabbir tal-patata jew tadam li jiġi wara dak imsemmi fl-inċiż ta' qabel u skond ciklu ta' rotazzjoni xieraq, għall-patata għall-produzzjoni taż-żerriegħ għandha tkun ta' sentejn, u studju uffiċjali għandu jitmexxa kif imfisser fl-Artikolu 2(1);
- jew
- (ii) matul il-hames snin ta' tkabbir ta' wara l-kontaminazzjoni speċifikata,
- miżuri għandhom jittiehdu sabiex jiġu eliminati pjanti tal-patata u tadam volontarji kif ukoll pjanti oħra ta' provenjenza ta' l-organizmu inkluż haxix hażin li jappartjeni għall-familja ta' pjanti *Solanaceae* misjuba b'mod naturali,
 - u
 - l-għalqa għandha tkun stabbilita u miżmuma matul l-ewwel tliet snin jew, fi stat mhux maħdum jew, b'ċereali skond ir-riskju identifikat, jew, f'mergha permanenti b'*close cutting* jew mergha intensif jew, b'haxix għall-produzzjoni taż-żerriegħa, segwita minn thawwil fis-sentejn ta' wara b'pjanti li mhumiex ta' provenjenza ta' l-organizmu li għalih m'hemm l-ebda riskju li l-organizmu jibqa' jgħix jew li jinfirex,

- fl-ewwel staġun ta' thawwil tal-patata jew tadam wara l-perjodu speċifikat fl-inċiż ta' qabel, u b'kundizzjoni li l-ghalqa instabet hielsa minn patata voluntiera u pjanti tat-tadam u pjanti ta' provenjenza ohra inkluż haxix hażin li jappartjeni lill-familja ta' pjanti *Solanaceae* waqt spezzjonijiet għal mill-anqas is-sentejn ta' tkabbir konsekuttivi qabel it-thawwil,
 - fil-każ tal-patata, tista' ssir produzzjoni taż-żerriegħa jew tal-varjazzjoni tal-patata,
 - fil-każ tal-patata u t-tadam, it-tuberi tal-patata, jew il-pjanti tat-tadam maħsuda, kif inhu l-każ, għandhom jiġu ttestjati skond il-proċedura mfissra fl-Anness II;
- (b) fl-ghelieqi l-ohrajn kollha tal-post ikkontaminat u bil-kondizzjoni li u b'kundizzjoni li l-korpi uffiċjali responsabbli huma sodisfatti li r-riskju li pjanti tal-patata u tat-tadam voluntiera u pjanti ta' provenjenza ohra misjuba b'mod naturali ta' l-organizmu inkluż haxix hażin li jappartjeni għall-familja tal-pjanti *solanaceae* kif inhu xieraq ġew eliminati:
 - matul is-sena ta' tkabbir ta' wara l-kontaminazzjoni speċifikata,
 - jew m'għandhomx jiġu mhawwla tuberi tal-patata jew żerriegħa ta' veru, jew pjanti ta' provenjenza ohra ta' l-organizmu,
 - jew
 - fil-każ tat-tuberi tal-patata, patata taż-żrieragħ ċertifikati jistgħu jiġu kkoltivati għall-produzzjoni tal-varjazzjonijiet tal-patata
 - fil-każ ta' pjanti tat-tadam, pjanti tat-tadam li huma kkoltivati minn żrieragħ li jilhqqu l-kundizzjonijiet tad-Direttiva 2000/29/KE jistgħu jiġu kkoltivati għall-produzzjoni tal-frott jekk,
 - matul it-tieni sena tal-koltivazzjoni ta' wara l-kontaminazzjoni speċifikata,
 - fil-każ tal-patata, żerriegħa tal-patata ċċertifikata biss jew patata taż-żerriegħa ttestjata għan-nuqqas ta' taħsir kannella u mkabbra taht kontroll uffiċjali f'postijiet tal-produzzjoni hliet daww imsemmija f'4.1 għandhom ikunu miżrugħa għall-produzzjoni taż-żerriegħa jew tal-varjazzjoni,
 - fil-każ tat-tadam, il-pjanti tat-tadam biss li huma kkoltivati minn żrieragħ li huma f'konformità mad-Direttiva 2000/29/KE jew, jekk huma ppropagati veġetattivament, minn pjanti tat-tadam li huma prodotti minn tali żrieragħ u kkoltivati taht kontrolli uffiċjali f'postijiet ta' produzzjoni li mhumiex dawkli jissemew fi 4.1, għandhom ikunu kkoltivati għall-produzzjoni tal-pjanti jew tal-frott.
 - għal mill-anqas it-tielet sena ta' żvilupp wara l-kontaminazzjoni speċifikata,
 - fil-każ tal-patata, tal-patata taż-żrieragħ iċċertifikata biss jew tal-patata taż-żrieragħ ikkoltivata taht kontroll uffiċjali minn patata taż-żrieragħ iċċertifikata għandha tiġi miżrugħa għall-produzzjoni taż-żerriegħ jew tal-varjazzjoni,
 - fil-każ tat-tadam, il-pjanti tat-tadam biss li huma kkoltivati minn żrieragħ li huma f'konformità mad-Direttiva 2000/29/KE jew pjanti tat-tadam li huma kkoltivati taht kontroll uffiċjali minn tali pjanti għandhom jiġu kkoltivati għall-produzzjoni tal-frott jew tal-pjanti
 - f'kull sena ta' koltivazzjoni li tisemma fl-inċiżi ta' qabel, il-miżuri għandhom jittiehdu sabiex jiġu eliminati pjanti tat-tadam voluntiera u pjanti ospitanti ohrajn li jeżistu naturalment ta' organiżmi jekk huma preżenti u, spezzjoni uffiċjali tal-pjanti għandha ssir fi żminijiet xierqa f'kull għalqa ta' patata, testjar uffiċjali tal-patata maħsuda għandu jsir skond il-proċedura mfassla fl-Anness II;
- (c) immedjatament wara l-ispeċifikazzjoni ta' kontaminazzjoni taht l-Artikolu 5(1)(a)(ii) u wara l-ewwel sena ta' tkabbir sussegwenti:
 - il-facilitajiet ta' makkinarju u ta' hażna kollha li jinsabu fuq il-post tal-produzzjoni u involuti fil-produzzjoni tal-patata u tat-tadam għandhom jitnaddfu u, fejn hu xieraq, disinfectati permezz ta' l-użu ta' metodi xierqa, kif speċifikat fil-punt 3,
 - kontrolli uffiċjali fuq il-programmi ta' l-irrigazzjoni u l-bexx, inklużi l-projibizzjoni tagħhom, għandhom jiġu introdotti kif inhu xieraq sabiex issir prevenzjoni tat-tixrid ta' l-organizmu;

- (d) f'unità tal-produzzjoni ta' prodott ta' l-għalqa protett speċifikat bħala kontaminat taht l-Artikolu 5(1)(a)(ii) fejn hi possibbli sostituzzjoni shiha tal-medju ta' tkabbir,
- l-ebda tuberu jew pjanta, żrieragh jew pjanti ta' provenjenza ohra ta' l-organizmu inkluż pjanti tat-tadam u żerriegħa m'għandhom jinżerghu sakemm l-unità tal-produzzjoni għet sogġetta għal miżuri ta' sorveljanza uffiċjali biex telimina l-organizmu u biex tneħhi kull materjal tal-pjanta ta' provenjenza, inkluż, mill-anqas, bidla kompluta fil-medju tat-tkabbir u hasil u, ingħata sussegwentement l-approvazzjoni għall-produzzjoni tal-patata jew tat-tadam mill-korpi uffiċjali responsabbli,
- u
- għall-produzzjoni tal-patata, din il-produzzjoni ser tkun minn zerriegħa tal-patata ċertifikati, jew minn tuberu żgħar jew mikro-pjanti derivati minn sorsi ttestjati,
 - għall-produzzjoni tat-tadam, din il-produzzjoni għandha tkun minn żrieragh li huma f'konformità mad-direttiva 2000/29/KE jew, jekk huma ppropagati veġetattivament, minn pjanti tat-tadam li huma prodotti minn tali żrieragh u kkoltivati taht kontroll uffiċjali,
 - kontrolli uffiċjali fuq il-programmi ta' l-irrigazzjoni u l-bexx, inklużi l-projbizzjoni tagħhom, għandhom jiġu introdotti kif inhu xieraq sabiex issir prevenzjoni tat-tixrid ta' l-organizmu;

4.2. fiż-żona demarkata, bla preġudizzju għall-miżuri mfissra taht 4.1, l-Istati Membri għandhom:

- (a) immedjatament wara l-kontaminazzjoni speċifikata, aċċerta li kull faċilità ta' makkinarju u impjant ta' hażna li huma involuti fil-produzzjoni tal-patata jew tat-tadam f'din il-proprjetà jiġu mnaddfa u disinfettati, kif inhu xieraq, u permezz ta' l-użu ta' metodi xierqa, kif speċifikat f'3,
- (b) immedjatament, u għal mill-anqas 3 snin ta' tkabbir wara l-kontaminazzjoni speċifikata:
- (ba) f'każijiet fejn iż-żona demarkata għet determinata taht l-Artikolu 5(1)(a)(iv),
- assigura s-supervizjoni mill-korpi uffiċjali responsabbli mill-proprjetà li tkabbar, taħżen jew timmanigġja tuberu tal-patata jew tadam, flimkien ma' proprjetà li topera makkinarju għall-produzzjoni b'kuntratt tal-patata jew tadam,
 - eżiġi t-thawwil ta' żerriegħa ċċerifikata biss jew ta' żerriegħa mkabbra taht kontroll uffiċjali għall-prodotti tal-patata f'dik iż-żona, u l-ittestjar wara l-hsad ta' prodotti tal-patata mkabbra f'postijiet tal-produzzjoni determinati bħala li huma probabbilment kontaminati taht l-Artikolu Article 5(1)(a)(iii),
 - eżiġi l-immaniġġjar separat ta' stokkijiet taż-żerriegħa tal-patata minn dawk tal-varjazzjoni fuq kull proprjetà fiż-żona, jew sistema ta' tindif u, fejn hu xieraq, disinfezzjoni li għandha ssir bejn l-immaniġġjar ta' stokkijiet taż-żerriegħa u tal-varjazzjoni,
 - itlob li ssir kultivazzjoni biss ta' pjanti ta' tadam li huma kkoltivati minn żrieragh li huma f'konformità mal-kundizzjonijiet tad-Direttiva 2000/29/KE jew, jekk huma ppropagati veġetattivament, minn pjanti ta' tadam li huma prodotti minn tali żrieragh u kkoltivati taht kontrolli uffiċjali, għal kull pjanta ta' tadam f'dik iż-żona,
 - mexxi studju uffiċjali kif imfisser fl-Artikolu 2(1),
- (bb) f'każijiet fejn l-ilma tal-wiċċ ġie speċifikat bħala kkontaminat taht l-Artikolu 5(1)(c)(ii) jew inkluż fl-elementi għall-firxa possibbli ta' l-organizmu skond l'Anness V punt 2,
- mexxi studju annwali f'żminijiet xierqa inkluż it-tehid ta' kampjuni ta' l-ilma tal-wiċċ u fejn hu xieraq pjanti ta' provenjenza li jappartjenu għall-familja ta' pjanti *solanaceae* fis-sorsi ta' l-ilma rilevanti u l-ittestjar skond il-metodi rilevanti misjuba fl-Anness II għall-materjal tal-pjanti elenkat u għal każijiet ohra.

- introduċi kontrolli uffiċjali fuq il-programmi ta' l-irrigazzjoni u t-traxxix, inkluż projbizzjoni fuq l-użu ta' l-ilma speċifikat bhala kontaminat għall-irrigazzjoni u t-traxxix ta' materjal tal-pjanti elenkat, u, fejn hu xieraq, pjanti ta' provenjenza oħra sabiex jipprevjeni l-firxa ta' l-organizmu. Din il-projbizzjoni tista' tiġi riveduta a bażi tar-riżultati miksuba fl-istudju annwali msemmi, u desinjazzjonijiet rivokati fejn il-korpi uffiċjali responsabbli huma sodisfatti li l-ilma tal-wiċċ m'għadux ikkontaminat. L-użu ta' ilma li hu suġġett għal projbizzjoni jista' jithalla, taht kontroll uffiċjali, għall-irrigazzjoni u t-traxxix ta' pjanti ta' provenjenza, fejn tekniki approvati uffiċjalment huma wżati li jeliminaw l-organizmu u jipprevjenu l-firxa tiegħu.
 - f'każijiet fejn gew kontaminati hruġ ta' skart likwidu, introduċi kontrolli uffiċjali fuq ir-rimi ta' skart jew hruġ ta' likwidu ta' skart minn proprjetajiet ta' pproċessar industrijali jew ta' ppakkjar li jimman-iġġjaw materjal tal-pjanti elenkat.
- (c) fejn hu xieraq, stabbilixxi programm għall-bdil ta' l-istokkijiet kollha taż-żerriegħa tal-patata tul perjodu ta' żmien xieraq.
-

ANNEX VII

Il-metodi ta' skart li huma uffiċjalment approvati li jissemmew fl-Anness VI paragrafu 1, għandhom jikkonformaw mad-dispożizzjonijiet li ġejjin sabiex riskji identifikabbli ta' tixrid ta' organiżmi huma ovvjati:

- (i) skart ta' patata u tadam (inklużi patata rrifjutata u qxur u tadam) u kull skart solidu iehor assoċjat mal-patata u t-tadam (inkluża ħamrija, ġebel u bċejjeċ) għandhom jiġu skartati jew,
- billi jintremew f'sit apposta uffiċjali dedikat għal hekk fejn ma hemm ebda riskju identifikabbli ta' ħarbien ta' l-organiżmu fl-ambjent eż permezz ta' nixxa fl-art agrikola jew kuntatt ma' eghjun ta' l-ilma li jistgħu jintużaw għall-irrigazzjoni ta' l-art agrikola. L-iskart għandu jitwassal direttament lejn is-sit taht kondizzjonijiet ta' konteniment sabiex ma jkun hemm ebda riskju ta' telf ta' skart,
- jew
- inċinerazzjoni,
- jew
- miżuri oħrajn, bil-kondizzjoni li ġie stabbilit li ma hemm ebda riskju identifikabbli għat-tixrid ta' l-organiżmu; tali miżuri għandhom jiġu nnotifikati lill-Kummissjoni u lill-Istati Membri l-oħrajn.
- (ii) skart likwidu: qabel l-iskartar, skart likwidu li fih solidi sospiżi fih għandu jkun soġġett għall-filtrazzjoni jew proċess ta' separazzjoni sabiex jitneħħew tali solidi. Dawn is-solidi għandhom jiġu skartati kif stipolat fis-subparagrafu (i).

L-iskart likwidu għandu imbagħad:

- jissahħan sa temperatura minima ta' 60 °C fil-volum kollu matul mill-inqas 30 minuta qabel l-iskartar,
- jew
- jiġi skartat skond approvazzjoni uffiċjali taht kontrolli uffiċjali li ma hemm ebda riskju identifikabbli li l-iskart jista' jiġi f'kuntatt ma' art agrikola jew eghjun ta' l-ilma li jistgħu jintużaw għall-irrigazzjoni ta' art agrikola. dawn id-dettallji għandhom jiġu nnotifikati lill-Kummissjoni u lill-Istati Membri l-oħrajn.

L-għażliet deskritti f'dan l-Anness japplikaw ukoll għall-iskart li huwa assoċjat mal-ġestjoni, l-iskartar u l-ipproċessar ta' lottijiet ikkontaminati.”