

DIRECTIVA 2006/63/CE DA COMISSÃO**de 14 de Julho de 2006****que altera os anexos II a VII da Directiva 98/57/CE do Conselho relativa ao controlo de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.***

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Europeia,

Tendo em conta a Directiva 98/57/CE do Conselho, de 20 de Julho de 1998, relativa ao controlo de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* ⁽¹⁾, nomeadamente o artigo 11.º,

Considerando o seguinte:

- (1) Um dos importantes organismos prejudiciais para a batateira e o tomateiro é a bactéria *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, patogéneo do pus ou mal murcho da batateira e do mal murcho do tomateiro (a seguir designada por «organismo»).
- (2) O organismo ainda existe em algumas regiões da Comunidade.
- (3) A Directiva 98/57/CE do Conselho estabeleceu medidas circunstanciadas a tomar nos Estados-Membros contra o organismo, a fim de o localizar e determinar a sua distribuição, evitar a sua ocorrência e dispersão e, quando detectado, evitar a sua dispersão e combatê-lo com vista à sua erradicação.
- (4) Desde então, registaram-se progressos significativos na compreensão da biologia e nos procedimentos de detecção e de identificação do organismo; além disso, a experiência prática adquirida no combate ao organismo exige a revisão de diversas disposições de ordem técnica relacionadas com as medidas de controlo do organismo.
- (5) Em resultado desses progressos, torna-se necessário rever e actualizar as medidas incluídas em determinados anexos da Directiva 98/57/CE.
- (6) Em relação aos procedimentos de detecção e identificação, inclui-se a hibridação fluorescente *in situ* (FISH), um método de detecção moderno. Foram também incluídas melhorias ao método de reacção em cadeia da polimerase (PCR), bem como melhorias de vários elementos técnicos

do actual procedimento de detecção e identificação, e métodos para a detecção e identificação do organismo em outras plantas hospedeiras que não a batateira assim como na água e no solo.

- (7) Quanto aos elementos técnicos das medidas de controlo, são previstas melhores disposições respeitantes: ao modo de conservação de amostras analisadas a fim de assegurar a rastreabilidade do organismo, aos elementos necessários para determinar a extensão da eventual contaminação, aos pormenores da notificação de qualquer presença confirmada do organismo e da zona contaminada e às medidas de implementação em locais de produção designados como estando contaminados e dentro de zonas demarcadas. Foram ainda incluídas algumas disposições respeitantes ao tomateiro, a fim de ter mais em conta a importância desta planta enquanto hospedeira do organismo.
- (8) As medidas previstas na presente directiva estão em conformidade com o parecer do Comité Fitossanitário Permanente,

ADOPTOU A PRESENTE DIRECTIVA:

Artigo 1.º

Os anexos II a VII da Directiva 98/57/CE são substituídos pelos textos correspondentes, incluídos no anexo da presente directiva.

Artigo 2.º

1. Os Estados-Membros adoptarão e publicarão, o mais tardar em 31 de Março de 2007, as disposições legislativas, regulamentares e administrativas necessárias para dar cumprimento à presente directiva. Os Estados-Membros comunicarão imediatamente à Comissão o texto dessas disposições, bem como um quadro de correspondência entre as referidas disposições e a presente directiva.

Os Estados-Membros devem aplicar essas disposições a partir de 1 de Abril de 2007.

Quando os Estados-Membros adoptarem tais disposições, estas devem incluir uma referência à presente directiva ou ser acompanhadas dessa referência aquando da sua publicação oficial. As modalidades dessa referência serão estabelecidas pelos Estados-Membros.

⁽¹⁾ JO L 235 de 21.8.1998, p. 1.

2. Os Estados-Membros comunicarão imediatamente à Comissão o texto das principais disposições de direito interno que adoptarem no domínio regido pela presente directiva.

Artigo 3.º

A presente directiva entra em vigor no terceiro dia seguinte ao da sua publicação no *Jornal Oficial da União Europeia*.

Artigo 4.º

Os Estados-Membros são os destinatários da presente directiva.

Feito em Bruxelas, em 14 de Julho de 2006.

Pela Comissão
Markos KYPRIANOU
Membro da Comissão

ANEXO

«ANEXO II

ESQUEMA DE ENSAIO PARA DIAGNÓSTICO, DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE RALSTONIA SOLANACEARUM (SMITH) YABUUCHI ET AL.

CONTEÚDO DO ESQUEMA DE ENSAIO

O esquema de ensaio apresentado descreve os vários procedimentos envolvidos:

- i) No diagnóstico do pus em tubérculos de batateira e de mal murcho em plantas de batateira, de tomateiro e outras plantas hospedeiras;
- ii) Na detecção de *Ralstonia solanacearum* em amostras de tubérculos de batateira, em plantas de batateira, de tomateiro e outras plantas hospedeiras, em água e no solo;
- iii) Na identificação de *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*).

ÍNDICE

	Página
	Princípios gerais
	40
SECÇÃO I:	Aplicação do esquema de ensaio
	40
	1. Esquema para o diagnóstico do pus e mal murcho (<i>R. solanacearum</i>) em tubérculos de batateira e em plantas de batateira, de tomateiro ou em outras plantas hospedeiras com sintomas pus ou mal murcho
	40
	2. Esquema para detecção e identificação de <i>R. solanacearum</i> em amostras de tubérculos de batateira assintomáticos
	43
	3. Esquema para detecção e identificação de <i>R. solanacearum</i> em amostras de plantas assintomáticas de batateira, tomateiro ou outras plantas hospedeiras
	46
SECÇÃO II:	Métodos pormenorizados de detecção de <i>R. solanacearum</i> em tubérculos de batateira e em plantas de batateira, tomateiro ou em outras plantas hospedeiras com sintomas de pus ou mal murcho
	48
	1. Sintomas
	48
	2. Testes rápidos de rastreio
	48
	3. Isolamento
	49
	4. Testes de identificação de <i>R. solanacearum</i>
	49
SECÇÃO III:	1. Métodos pormenorizados de detecção e identificação de <i>R. solanacearum</i> em amostras de tubérculos de batateira assintomáticos
	49
	1.1. Preparação da amostra
	49
	1.2. Ensaio
	51
	2. Métodos pormenorizados de detecção e identificação de <i>R. solanacearum</i> em amostras de plantas assintomáticas de batateira, tomateiro ou outras plantas
	51
	2.1. Preparação da amostra
	51
	2.2. Ensaio
	52
SECÇÃO IV:	1. Esquema para detecção e identificação de <i>R. solanacearum</i> em água
	53
	2. Métodos de detecção e identificação de <i>R. solanacearum</i> em água
	55
	2.1. Preparação da amostra
	55
	2.2. Ensaio
	55
SECÇÃO V:	1. Esquema para detecção e identificação de <i>R. solanacearum</i> no solo
	56
	2. Métodos de detecção e identificação de <i>R. solanacearum</i> no solo
	58
	2.1. Preparação das amostras
	58
	2.2. Ensaio
	58

	Página
SECÇÃO VI: Protocolos otimizados para detecção e identificação de <i>R. solanacearum</i>	58
A. Testes de diagnóstico e detecção	58
1. Teste de exsudação do caule	58
2. Detecção de grânulos de poli-β-hidroxibutirato	58
3. Testes serológicos de aglutinação	59
4. Isolamento selectivo	60
4.1. Diluição em placas com meio selectivo	60
4.2. Enriquecimento selectivo	60
5. Teste de imunofluorescência (teste IF)	61
6. Teste de reacção em cadeia da polimerase (teste PCR)	64
6.1. Métodos de purificação do ADN	65
a) Método de acordo com Pastrik (2000)	65
b) Outros métodos	65
6.2. PCR	66
6.3. Análise do produto da PCR	66
7. Teste de hibridação fluorescente <i>in situ</i> (teste FISH)	67
8. Testes de adsorção imunoenzimática (ELISA)	69
a) Teste ELISA indirecto	69
b) DASI ELISA (teste indirecto de adsorção imunoenzimática por sanduiche de duplo anticorpo)	70
9. Bioensaio	71
B. Testes de identificação	72
1. Testes nutricionais e enzimáticos	72
2. Teste IF	72
3. Teste ELISA	73
4. Teste PCR	73
5. Teste FISH	73
6. Perfis de ácidos gordos (FAP)	73
7. Métodos para caracterização da estirpe	73
7.1. Determinação do biovar	73
7.2. “Genomic fingerprinting”	74
7.3. Métodos PCR	74
C. Teste de confirmação	74
Apêndice 1 Laboratórios que participaram na optimização e validação de protocolos	76
Apêndice 2 Meios para isolamento e cultura de <i>R. solanacearum</i>	77
Apêndice 3 (A) Material de controlo normalizado disponível no mercado	79
(B) Preparação de controlos	80
Apêndice 4 Tampões para a realização dos testes	82
Apêndice 5 Determinação do nível de contaminação em testes IF e FISH	85
Apêndice 6 Protocolos e reagentes validados para PCR	86
Apêndice 7 Reagentes validados para o teste FISH	91
Apêndice 8 Condições de cultivo de beringela e tomateiro	93
Referências bibliográficas	94

PRINCÍPIOS GERAIS

Nos apêndices são apresentados protocolos otimizados para os diversos métodos, reagentes validados e pormenores respeitantes à preparação dos materiais para realização dos testes e dos controlos. No apêndice 1 é fornecida uma lista dos laboratórios incluídos na optimização e validação de protocolos.

Uma vez que os protocolos envolvem a detecção de um organismo de quarentena e incluirão a utilização de culturas viáveis de *R. solanacearum* como materiais de controlo, será necessário realizar os procedimentos em condições de quarentena adequadas, em instalações com sistemas apropriados de eliminação de resíduos e possuindo as licenças adequadas, emitidas pelas autoridades oficiais competentes em matéria de quarentena fitossanitária.

Os parâmetros dos ensaios devem garantir a detecção consistente e reprodutível de níveis de *R. solanacearum* nos limiares estabelecidos para os métodos seleccionados.

É imperiosa a preparação rigorosa de controlos positivos.

A realização dos ensaios de acordo com os limiares exigidos implica igualmente uma regulação, manutenção e calibração correctas do equipamento, uma manipulação e conservação cuidadosas dos reagentes e estabelecimento de todas as medidas destinadas a evitar contaminações entre amostras, por exemplo, a separação de controlos positivos das amostras a testar. Devem ser aplicadas normas de controlo de qualidade a fim de evitar, nomeadamente, erros administrativos, em especial no tocante à rotulagem e à documentação.

Uma ocorrência suspeita, conforme referido no n.º 2 do artigo 4.º da Directiva 98/57/CE, implica um resultado positivo nos testes de diagnóstico ou de rastreio efectuados numa amostra, conforme especificado nos fluxogramas a seguir indicados. Um primeiro teste de rastreio positivo (teste IF, PCR/FISH, isolamento selectivo) deve ser confirmado por um segundo teste de rastreio baseado num princípio biológico diferente.

Caso o primeiro teste de rastreio seja positivo, suspeitar-se-á de contaminação por *R. solanacearum*, devendo proceder-se a um segundo teste de rastreio. Caso o segundo teste de rastreio seja positivo, será confirmada a suspeita (ocorrência suspeita), devendo prosseguir-se a verificação de acordo com o esquema. Caso o segundo teste de rastreio seja negativo, considerar-se-á que a amostra não está contaminada por *R. solanacearum*.

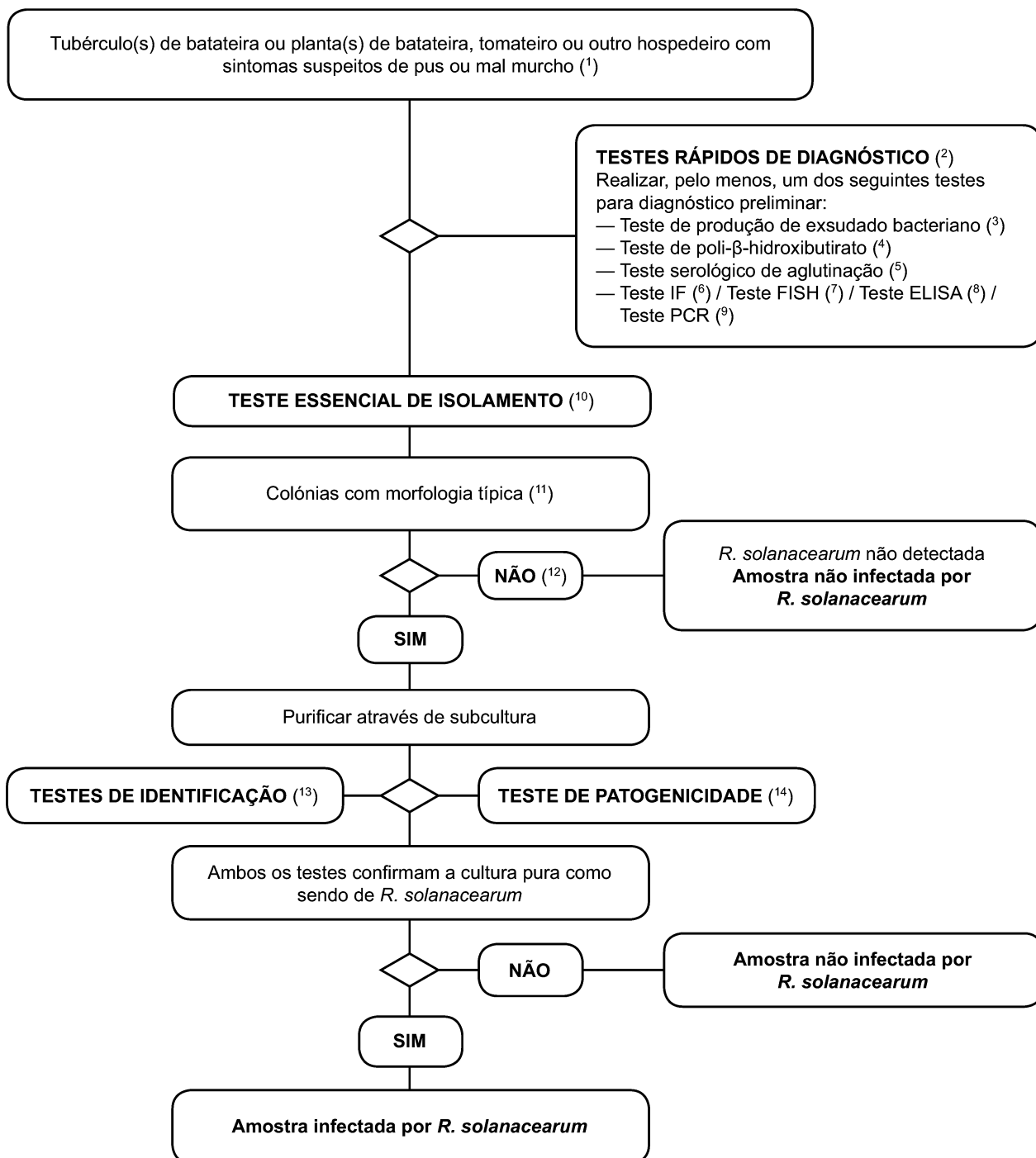
A presença confirmada, conforme referido no n.º 1 do artigo 5.º da Directiva 98/57/CE, implica o isolamento e a identificação de uma cultura pura de *R. solanacearum* com confirmação de patogenicidade.

SECÇÃO I

APLICAÇÃO DO ESQUEMA DE ENSAIO

1. Esquema para o diagnóstico do pus e mal murcho (*Ralstonia solanacearum*) em tubérculos de batateira e em plantas de batateira, tomateiro ou outras plantas hospedeiras com sintomas.

O procedimento laboratorial destina-se a tubérculos de batateira e a plantas com sintomas típicos ou suspeitos de pus ou mal murcho. Implica um teste rápido de rastreio, isolamento do patógeno a partir do tecido vascular infectado num meio de cultura (selectivo) e, em caso de resultado positivo, identificação da cultura como *Ralstonia solanacearum*.



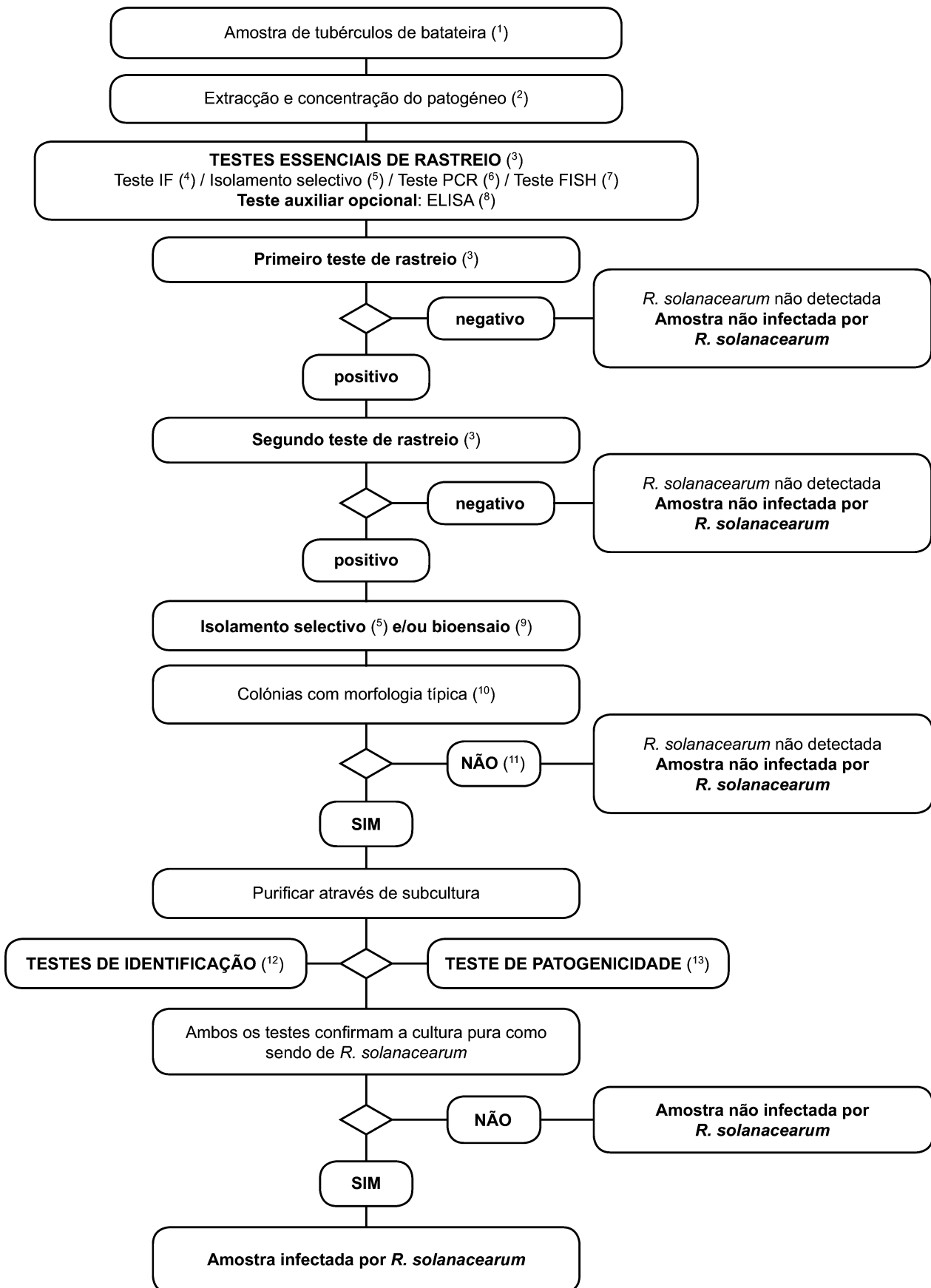
- (¹) A descrição dos sintomas é apresentada no ponto 1 da secção II.
- (²) Os testes rápidos de diagnóstico facilitam o diagnóstico inicial, mas não são essenciais. Um resultado negativo nem sempre garante a ausência do patogéneo.
- (³) O teste de produção de exsudado bacteriano proveniente do tecido vascular do caule é descrito na parte A, ponto 1, da secção VI.
- (⁴) O teste para detecção de grânulos de poli- β -hidroxibutirato em células bacterianas é descrito na parte A, ponto 2, da secção VI.
- (⁵) Os testes serológicos de aglutinação com exsudado bacteriano ou extractos de material vegetal com sintomas são descritos na parte A, ponto 3, da secção VI.
- (⁶) O teste IF com exsudado bacteriano em suspensão aquosa ou em extractos de material vegetal com sintomas é descrito na parte A, ponto 5, da secção VI.
- (⁷) O teste FISH com exsudado bacteriano em suspensão aquosa ou em extractos de material vegetal com sintomas é descrito na parte A, ponto 7, da secção VI.
- (⁸) O teste ELISA com exsudado bacteriano em suspensão aquosa ou em extractos de material vegetal com sintomas é descrito na parte A, ponto 8, da secção VI.
- (⁹) O teste PCR com exsudado bacteriano em suspensão aquosa ou em extractos de material vegetal com sintomas é descrito na parte A, ponto 6, da secção VI.
- (¹⁰) Regra geral, o patogéneo é facilmente isolado a partir de material vegetal com sintomas através do teste de diluição em placas (ponto 3 da secção II).
- (¹¹) A morfologia típica das colónias é descrita no ponto 3, alínea d), da secção II.
- (¹²) Poderá não ser possível isolar a bactéria a partir de material vegetal em fase avançada de infecção devido à competição e/ou excessivo desenvolvimento de colónias de bactérias saprófitas. Caso os sintomas da doença sejam típicos mas o teste de isolamento seja negativo, deve repetir-se o isolamento, de preferência através de um teste de diluição em placas com meio selectivo.
- (¹³) Obtém-se uma identificação fiável de culturas puras de presumíveis isolados de *R. solanacearum* através dos testes descritos na parte B da secção VI. A caracterização intra-específica é facultativa mas recomendada para cada novo caso.
- (¹⁴) O teste de patogenicidade é descrito na parte C da secção VI.

2. **Esquema para detecção e identificação de *Ralstonia solanacearum* em amostras de tubérculos de batateira assintomáticos**

Princípio:

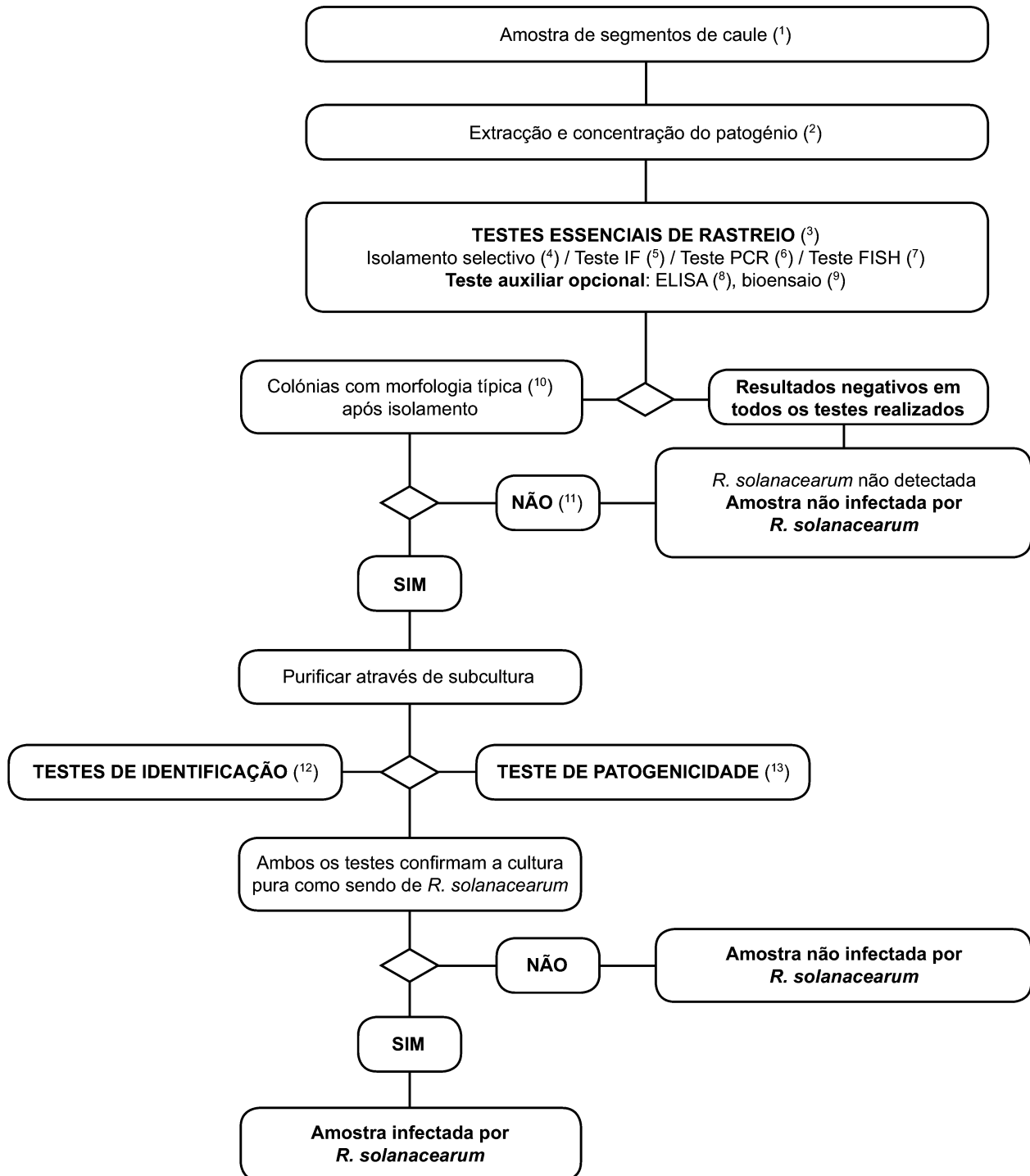
O procedimento laboratorial destina-se a detectar infecções latentes em tubérculos de batateira. Um resultado positivo em, pelo menos, dois testes de rastreio³, com base em princípios biológicos diferentes, deve ser complementado com o isolamento do patógeno, seguido, em caso de isolamento de colónias típicas, de confirmação da identificação da cultura pura como sendo *R. solanacearum*. Um resultado positivo em apenas um dos testes de rastreio não é suficiente para considerar a amostra suspeita.

Os testes de rastreio e os testes de isolamento devem permitir detectar 10^3 a 10^4 células por ml de sedimento ressuspenso, incluídos como controlos positivos em cada série de testes.



- (¹) A dimensão normal da amostra é de 200 tubérculos, embora este procedimento possa ser usado com amostras menores, caso não se disponha de 200 tubérculos.
- (²) Os métodos de extracção e concentração do patogéneo são descritos no ponto 1.1 da secção III.
- (³) Se, pelo menos, dois testes baseados em princípios biológicos diferentes forem positivos, deverá proceder-se ao isolamento e à confirmação. Realizar, pelo menos, um teste de rastreio. Se este teste for negativo, a amostra é considerada negativa. Caso este teste seja positivo, é necessário realizar um segundo ou mais testes de rastreio baseados em princípios biológicos diferentes para verificar o primeiro resultado positivo. Se o segundo ou mais testes forem negativos, a amostra é considerada negativa. Não são necessários mais testes.
- (⁴) O teste IF é descrito na parte A, ponto 5, da secção VI.
- (⁵) O teste de isolamento selectivo é descrito na parte A, ponto 4, da secção VI.
- (⁶) Os testes PCR são descritos na parte A, ponto 6, da secção VI.
- (⁷) O teste FISH é descrito na parte A, ponto 7, da secção VI.
- (⁸) Os testes ELISA são descritos na parte A, ponto 8, da secção VI.
- (⁹) O bioensaio é descrito na parte A, ponto 9, da secção VI.
- (¹⁰) A morfologia típica das colónias é descrita no ponto 3, alínea d), da secção II.
- (¹¹) O isolamento ou os bioensaios podem conduzir à obtenção de falsos resultados negativos devido à competição ou inibição por bactérias saprófitas. Caso se obtenham resultados positivos claros nos testes de rastreio, mas os testes de isolamento sejam negativos, repetir então os testes de isolamento com o mesmo sedimento ou colhendo tecido vascular adicional próximo da região do hilo dos tubérculos da mesma amostra já cortados e, se necessário, testar amostras adicionais.
- (¹²) Obtém-se uma identificação fiável de culturas puras de presumíveis isolados de *R. solanacearum* através dos testes descritos na parte B da secção VI.
- (¹³) O teste de patogenicidade é descrito na parte C da secção VI.

3. Esquema para detecção e identificação de *Ralstonia solanacearum* em amostras de plantas assintomáticas de batateira, tomateiro ou outras plantas hospedeiras



- (¹) Ver ponto 2.1 da secção III para a dimensão recomendada das amostras.
- (²) Os métodos de extracção e concentração do patogéneo são descritos no ponto 2.1 da secção III.
- (³) Se, pelo menos, dois testes baseados em princípios biológicos diferentes forem positivos, deverá proceder-se ao isolamento e à confirmação. Realizar, pelo menos, um teste de rastreio. Se este teste for negativo, a amostra é considerada negativa. Caso este teste seja positivo, é necessário realizar um segundo ou mais testes de rastreio baseados em princípios biológicos diferentes para verificar o primeiro resultado positivo. Se o segundo ou mais testes forem negativos, a amostra é considerada negativa. Não são necessários mais testes.
- (⁴) O teste de isolamento selectivo é descrito na parte A, ponto 4, da secção VI.
- (⁵) O teste IF é descrito na parte A, ponto 5, da secção VI.
- (⁶) Os testes PCR são descritos na parte A, ponto 6, da secção VI.
- (⁷) O teste FISH é descrito na parte A, ponto 7, da secção VI.
- (⁸) Os testes ELISA são descritos na parte A, ponto 8, da secção VI.
- (⁹) O bioensaio é descrito na parte A, ponto 9, da secção VI.
- (¹⁰) A morfologia típica das colónias é descrita no ponto 3, alínea d), da secção II.
- (¹¹) O isolamento ou os bioensaios podem conduzir à obtenção de falsos resultados negativos devido à competição ou inibição por bactérias saprófitas. Caso se obtenham resultados positivos nos testes de rastreio, mas os testes de isolamento forem negativos, deverão repetir-se os testes de isolamento.
- (¹²) Obtém-se uma identificação fiável de culturas puras de presumíveis isolados de *R. solanacearum* através dos testes descritos na parte B da secção VI.
- (¹³) O teste de patogenicidade é descrito na parte C da secção VI.

SECÇÃO II

MÉTODOS PORMENORIZADOS DE DETECÇÃO DE RALSTONIA SOLANACEARUM EM TUBÉRCULOS DE BATATEIRA E EM PLANTAS DE BATATEIRA, TOMATEIRO OU OUTRAS PLANTAS HOSPEDEIRAS COM SINTOMAS DE PUS OU MAL MURCHO**1. Sintomas** (ver <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>)**1.1. Sintomas na batateira**

Planta da batateira. Na fase inicial de infecção no campo, verifica-se uma murchidão das folhas na parte superior da planta a temperaturas elevadas e durante o dia, com recuperação à noite. Na fase inicial de murchidão, as folhas mantêm-se verdes mas, posteriormente, desenvolve-se uma clorose seguida de necrose. Observa-se também epinastia. A murchidão de um rebento ou de toda a planta torna-se rapidamente irreversível, resultando no colapso e na morte da planta. O tecido vascular dos caules de plantas afectadas cortados transversalmente apresenta-se necrosado e um exsudado bacteriano de cor esbranquiçada emerge da superfície cortada ou pode ser extraído apertando o caule entre os dedos. Quando um caule cortado é colocado verticalmente em água, observa-se a exsudação de um líquido viscoso a partir dos feixes vasculares.

Tubérculo de batateira. Os tubérculos de batateira têm que ser cortados transversalmente junto do hilo (extremidade do estolho) ou longitudinalmente sobre a extremidade do estolho. Na fase inicial de infecção, verifica-se uma coloração amarela vítrea ou castanha clara no anel vascular, pelo qual emerge espontaneamente, após alguns minutos, um exsudado bacteriano de cor creme clara. Mais tarde, a descoloração vascular assume um tom castanho mais nítido e a necrose pode alastrar ao parênquima. Nas fases mais avançadas, a infecção progride a partir do hilo e dos "olhos", nos quais se pode manifestar exsudação bacteriana que origina a adesão de partículas de terra. Poderão apresentar-se lesões na epiderme de cor vermelha acastanhada, em ligeira depressão, por colapso interno dos tecidos vasculares. Nas fases avançadas da doença, é comum o desenvolvimento de podridões moles secundárias causadas por fungos ou bactérias.

1.2. Sintomas no tomateiro

Planta de tomateiro. Os primeiros sintomas visíveis são o aspecto flácido das folhas mais jovens. Em condições ambientais favoráveis ao patogéneo (temperatura do solo de 25 °C, humidade saturada), surge dentro de poucos dias a epinastia e a murchidão de um lado ou de toda a planta, conduzindo ao total colapso da planta. Em condições menos favoráveis (temperatura do solo inferior a 21 °C), observa-se uma menor murchidão, mas pode desenvolver-se no caule um grande número de raízes adventícias. Podem observar-se manchas hidrópicas alongadas a partir da base do caule, que evidenciam a necrose do sistema vascular. Quando o caule é cortado transversalmente, os seus tecidos vasculares apresentam uma coloração acastanhada e exsudam gotas de líquido viscoso branco ou amarelado, que contêm células bacterianas.

1.3. Sintomas noutros hospedeiros

Plantas de Solanum dulcamara e S. nigrum. Em condições naturais, os sintomas de murchidão são raramente observados nestas infestantes hospedeiras, a menos que as temperaturas do solo ultrapassem os 25 °C ou que os níveis de inóculo sejam extremamente elevados (por exemplo, no caso de *S. nigrum* que cresce junto de plantas de batateira ou de tomateiro doentes). Quando efectivamente ocorre a murchidão, os sintomas são iguais aos descritos para o tomateiro. As plantas de *S. dulcamara* que não apresentam murchidão e com os caules e raízes imersos em água poderão apresentar uma coloração castanha clara dos tecidos vasculares em secções transversais da base do caule ou de outras partes do caule que se encontrem submersas. Mesmo na ausência de sintomas de murchidão, pode manifestar-se a presença de exsudado bacteriano a partir de cortes de tecido vascular ou observar-se esse exsudado se o caule, cortado transversalmente, for colocado verticalmente em água.

2. Testes rápidos de rastreio

Os testes rápidos de rastreio poderão facilitar o diagnóstico preliminar, mas não são essenciais. Utilizar um ou mais dos seguintes testes validados:

2.1. Teste de exsudação do caule

(Ver parte A, ponto 1, da secção VI.)

2.2. Detecção de grânulos de poli-β-hidroxibutirato (PHB)

Os grânulos característicos de PHB nas células de *R. solanacearum* são visualizados através da coloração com azul de Nilo A ou com negro de Sudão de esfregaços de exsudado bacteriano provenientes de tecido vegetal infectado fixados pelo calor numa lâmina de microscópio (ver parte A, ponto 2, da secção VI).

2.3. Testes serológicos de aglutinação

(Ver parte A, ponto 3, da secção VI.)

2.4. Outros testes

Outros testes rápidos de rastreio considerados apropriados são o teste IF (ver parte A, ponto 5, da secção VI), o teste FISH (ver parte A, ponto 7, da secção VI), os testes ELISA (ver parte A, ponto 8, da secção VI) e os testes PCR (ver parte A, ponto 6, da secção VI).

3. Isolamento

- a) Retirar o exsudado ou secções do tecido necrosado do anel vascular do tubérculo ou da zona vascular do caule da planta de batateira, tomateiro ou outras plantas hospedeiras com sintomas de murchidão. Efectuar uma suspensão num pequeno volume de água destilada esterilizada ou de tampão fosfato 50 mM (apêndice 4) e deixar em repouso durante 5 a 10 minutos.
- b) Preparar uma série de diluições decimais da suspensão.
- c) Transferir 50-100 µl da suspensão para um meio nutritivo geral (NA, YPGA ou SPA, ver apêndice 2) e/ou para o meio de tetrazólio de Kelman (apêndice 2) e/ou para um meio selectivo validado (por exemplo, SMSA, ver apêndice 2). Espalhar ou efectuar um reticulado com uma técnica adequada de diluição em placas. Se necessário, preparar um conjunto separado de placas com uma suspensão diluída de células de *R. solanacearum* Biovar 2 como controlo positivo.
- d) Incubar as placas durante 2 a 6 dias a 28 °C.
 - Em meios nutritivos gerais, os isolados virulentos de *R. solanacearum* produzem colónias de cor branco-pérola, achatadas, irregulares e fluidas, exibindo muitas vezes espirais características no centro. Formas avirulentas de *R. solanacearum* apresentam pequenas colónias butirosas redondas e não fluidas de coloração esbranquiçada.
 - Nos meios de tetrazólio de Kelman e SMSA, as espirais são de cor vermelha viva. As formas avirulentas de *R. solanacearum* apresentam pequenas colónias butirosas redondas e não fluidas que são completamente vermelho-escuras.

4. Testes de identificação de *R. solanacearum*

Testes para confirmar a identidade de presumíveis isolados de *R. solanacearum* são descritos na parte B da secção VI.

SECÇÃO III

1. Métodos pormenorizados de detecção e identificação de *Ralstonia solanacearum* em amostras de tubérculos de batateira assintomáticos

1.1. Preparação da amostra

Nota:

- A dimensão normal da amostra é de 200 tubérculos por teste. Uma amostragem mais intensiva exige a realização de mais testes em amostras desta dimensão. Uma amostra com um maior número de tubérculos conduzirá à incapacidade ou a uma maior dificuldade de interpretação dos resultados. Contudo, este procedimento pode ser aplicado a amostras com menos de 200 tubérculos, sempre que este número de tubérculos não se encontre disponível.
- A validação de todos os métodos de detecção abaixo descritos tem por base a análise de amostras constituídas por 200 tubérculos.
- O extracto de batata descrito em seguida pode também ser utilizado para a detecção da bactéria *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, responsável pela podridão anelar da batateira.

Pré-tratamento opcional antes da preparação da amostra:

- a) Incubação de amostras a uma temperatura de 25-30 °C durante um período de até 2 semanas, para favorecer a multiplicação de quaisquer populações de *R. solanacearum*.
- b) Lavar os tubérculos. Utilizar desinfetantes (compostos de cloro sempre que se utilizar o teste PCR para destruir ADN de organismos saprófitas) e detergentes adequados entre cada amostra. Secar os tubérculos ao ar. Este procedimento de lavagem é particularmente útil (mas não obrigatório) para amostras que apresentem um excesso de terra e quando se pretende realizar um teste PCR ou um isolamento directo.

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

Nota: Pôr de lado quaisquer tubérculos (com podridões) que exibam sintomas suspeitos de pus e testá-los separadamente.

Caso se observem sintomas suspeitos de pus durante a remoção do cone da zona do hilo, deve proceder-se a uma inspecção visual do tubérculo em questão e este deverá ser cortado próximo do hilo. Qualquer tubérculo cortado exibindo sintomas suspeitos deverá ser mantido durante, pelo menos, dois dias à temperatura ambiente, no sentido de permitir a suberização, e em seguida armazenado numa área refrigerada (entre 4 a 10 °C) em condições de quarentena adequadas. Todos os tubérculos, incluindo os que apresentam sintomas suspeitos, devem ser conservados de acordo com o anexo III.

- 1.1.2. Colocar os cones dos hilos em recipientes descartáveis não utilizados que possam ser fechados e/ou selados (caso os recipientes sejam reutilizados devem ser cuidadosamente limpos e desinfectados com compostos de cloro). Os cones dos hilos devem ser, de preferência, processados de imediato. Se tal não for possível, deverão ser mantidos no recipiente, sem adição de tampão, em local refrigerado durante, no máximo, 72 horas, ou 24 horas à temperatura ambiente.

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

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

ou

- b) Homogeneizar os cones com um volume suficiente (cerca de 40 ml) de tampão de extracção (apêndice 4) num misturador (por exemplo, Waring Blender ou Ultra Thurrax) ou por esmagamento num saco de maceiração descartável selado (por exemplo, Stomacher ou Bioreba, em polietileno resistente, de 150 mm x 250 mm, esterilizado por radiação) utilizando um macete de borracha ou um instrumento de trituração adequado (por exemplo, Homex).

Nota: O risco de contaminação cruzada das amostras é elevado quando estas são homogeneizadas com recurso a um misturador. Tomar as precauções necessárias para evitar a formação de aerossóis ou derrames durante o processo de extracção. Assegurar-se de que as lâminas e os recipientes do misturador utilizados para cada amostra foram recentemente esterilizados. Caso se utilize o teste PCR, evitar a contaminação por ADN dos recipientes ou instrumento de trituração. Sempre que se utilize o teste PCR, recomenda-se a trituração em sacos descartáveis e a utilização de tubos descartáveis.

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

- 1.1.4. Concentrar a fracção bacteriana por centrifugação a 7 000 g durante 15 minutos (ou 10 000 g durante 10 minutos) a uma temperatura entre 4 e 10 °C e desprezar o sobrenadante sem perturbar o sedimento.

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

Não se aconselha a congelação e descongelação repetidas.

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

- 1.1.6. É indispensável que todas as amostras e controlos positivos de *R. solanacearum* sejam tratados separadamente para evitar contaminações. O mesmo se aplica às lâminas de imunofluorescência e a todos os testes.

1.2. Ensaio

Ver fluxograma e descrição dos testes e protocolos otimizados nos respectivos apêndices:

Isolamento selectivo (Ver parte A, ponto 4, da secção VI)

Teste IF (Ver parte A, ponto 5, da secção VI)

Testes PCR (Ver parte A, ponto 6, da secção VI)

Teste FISH (Ver parte A, ponto 7, da secção VI)

Testes ELISA (Ver parte A, ponto 8, da secção VI)

Bioensaio (Ver parte A, ponto 9, da secção VI)

2. Métodos pormenorizados de detecção e identificação de *R. solanacearum* em amostras de plantas assintomáticas de batateira, tomateiro ou outras plantas hospedeiras

2.1. Preparação da amostra

Nota: Para a detecção de populações latentes de *R. solanacearum*, é aconselhável a análise de amostras compostas. O procedimento pode ser aplicado convenientemente a amostras compostas contendo até 200 partes de caule. Sempre que forem realizadas prospeções, estas devem basear-se numa amostra estatisticamente representativa da população de plantas em estudo.

2.1.1. Recolher segmentos de caule de 1-2 cm num recipiente esterilizado fechado, de acordo com os seguintes procedimentos de amostragem:

Plântulas de tomateiro de viveiro: Com uma faca limpa e desinfetada, remover um segmento de 1 cm da base de cada caule, imediatamente acima do nível do solo.

Plantas de tomateiro cultivadas no campo ou em estufa: Com uma faca limpa e desinfetada, remover o rebento lateral inferior de cada planta, cortando-o imediatamente acima do ponto de junção com o caule principal. Remover o segmento inferior de 1 cm de cada rebento lateral.

Outros hospedeiros: Com uma faca ou uma tesoura de poda limpas e desinfetadas, remover um segmento de 1 cm da base de cada caule, imediatamente acima do nível do solo. No caso da *S. dulcamara* ou de outras plantas hospedeiras aquáticas, retirar secções de 1-2 cm dos caules ou estolhos que se encontrem submersos com raízes aquáticas.

Ao colher amostras de um determinado local, recomenda-se a análise de uma amostra estatisticamente representativa de, pelo menos, 10 plantas de cada potencial hospedeiro infestante por ponto de amostragem. A detecção do patógeno será mais fiável no final da Primavera, no Verão e no Outono, embora se possam detectar infecções naturais durante todo o ano em *Solanum dulcamara* perene que cresce em cursos de água. Alguns hospedeiros conhecidos incluem plantas da batateira espontâneas (zorras), *Solanum dulcamara*, *S. nigrum*, *Datura stramonium* e outros membros da família *Solanaceae*. Outros hospedeiros são o *Pelargonium* spp. e *Portulaca oleracea*. Algumas espécies de infestantes europeias que podem ser potenciais hospedeiros de populações de *R. solanacearum* Biovar 2/Raça 3 nas raízes e/ou rizosfera, em condições ambientais específicas, incluem *Atriplex hastata*, *Bidens pilosa*, *Cerastium glomeratum*, *Chenopodium album*, *Eupatorium cannabinum*, *Galinsoga parviflora*, *Ranunculus scleratus*, *Rorippa* spp., *Rumex* spp., *Silene alba*, *S. nutans*, *Tussilago farfara* e *Urtica dioica*.

Nota: O exame visual dos sintomas internos (descoloração vascular ou produção de exsudado bacteriano) pode ser feito nesta fase. Pôr de lado qualquer segmento de caule que exiba sintomas e testá-lo separadamente (ver secção II).

2.1.2. Desinfetar rapidamente os segmentos de caule com etanol a 70 % e secar imediatamente com papel absorvente. Em seguida, processar os segmentos de caule de acordo com um dos seguintes procedimentos:

- a) Cobrir os segmentos com um volume suficiente (cerca de 40 ml) de tampão de extracção (apêndice 4) e colocá-los num agitador rotativo (50-100 rpm) durante 4 horas a uma temperatura inferior a 24 °C ou durante 16-24 horas em local refrigerado, ou
- b) Processar imediatamente, esmagando os segmentos num saco de maceração resistente (por exemplo, Stomacher ou Bioreba) com um volume adequado de tampão de extracção (apêndice 4), com recurso a um macete de borracha ou um instrumento de trituração adequado (por exemplo, Homex). Se tal não for possível, armazenar os segmentos de caule refrigerados durante, no máximo, 72 horas, ou 24 horas à temperatura ambiente.

2.1.3. Decantar o sobrenadante após 15 minutos de repouso.

2.1.4. Não é normalmente necessário proceder à clarificação do extracto ou à concentração da fracção bacteriana, mas estes objectivos poderão alcançar-se através de filtração e/ou centrifugação, tal como descrito nos pontos 1.1.3 a 1.1.5 da secção III.

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

2.2. Ensaio

Ver fluxograma e descrição dos testes e protocolos optimizados nos respectivos apêndices:

Isolamento selectivo (Ver parte A, ponto 4, da secção VI)

Teste IF (Ver parte A, ponto 5, da secção VI)

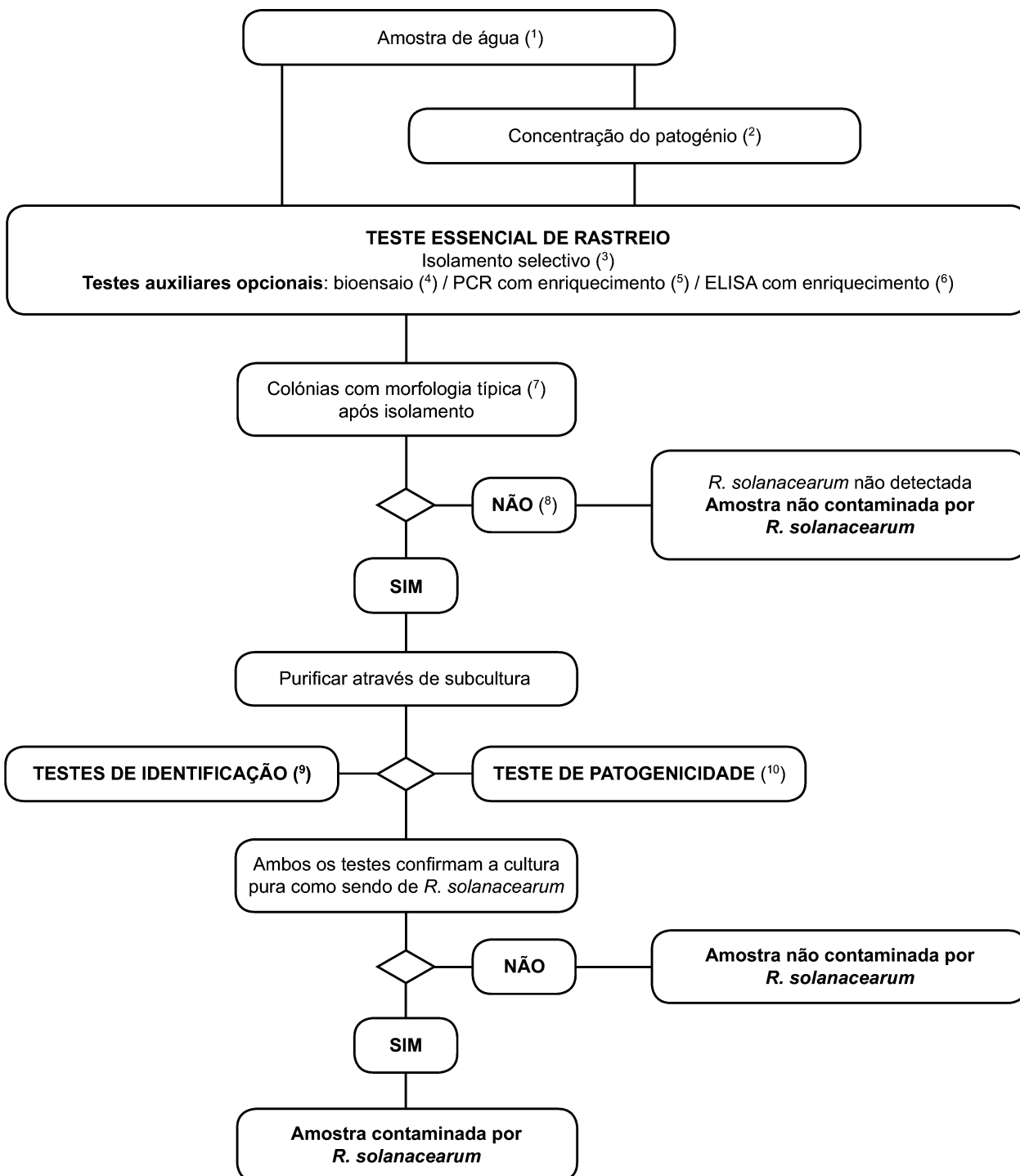
Testes PCR (Ver parte A, ponto 6, da secção VI)

Teste FISH (Ver parte A, ponto 7, da secção VI)

Testes ELISA (Ver parte A, ponto 8, da secção VI)

Bioensaio (Ver parte A, ponto 9, da secção VI)

SECÇÃO IV

1. Esquema para detecção e identificação de *R. solanacearum* em água

- (¹) Ver ponto 2.1 da secção IV para os procedimentos de amostragem recomendados.
- (²) Os métodos de concentração do patogéneo estão descritos no ponto 2.1 da secção IV. A concentração aumenta as populações de patogéneos e de bactérias saprófitas concorrentes e só é recomendada se não resultar na inibição do isolamento da bactéria.
- (³) O teste de isolamento selectivo é descrito na parte A, ponto 4, da secção VI.
- (⁴) O bioensaio é descrito na parte A, ponto 9, da secção VI.
- (⁵) Os métodos PCR com enriquecimento são descritos na parte A, pontos 4.2 e 6, da secção VI.
- (⁶) Os métodos ELISA com enriquecimento são descritos na parte A, pontos 4.2 e 8, da secção VI.
- (⁷) A morfologia típica das colónias é descrita no ponto 3, alínea d), da secção II.
- (⁸) Poderá não ser possível isolar a bactéria devido à competição ou inibição por bactérias saprófitas. Caso se suspeite que a existência de elevados níveis populacionais de saprófitas afecta a fiabilidade do isolamento, repetir o isolamento após diluição da amostra em água esterilizada.
- (⁹) Obtém-se uma identificação fiável de culturas puras de presumíveis isolados de *R. solanacearum* através dos testes descritos na parte B da secção VI.
- (¹⁰) O teste de patogenicidade é descrito na parte C da secção VI.

2. Métodos de detecção e identificação de *R. solanacearum* em água

Princípio

O esquema de detecção validado descrito nesta secção é aplicável à detecção do patógeno em amostras de águas superficiais, podendo também ser aplicado a amostras de efluentes de transformação de batata ou de esgotos. Contudo, é importante notar que a sensibilidade de detecção esperada irá variar consoante o substrato. A sensibilidade do teste de isolamento é afectada pelas populações de bactérias saprófitas competidoras, normalmente muito superiores nos efluentes de transformação de batata e de esgotos do que nas águas superficiais. Embora se espere que o esquema a seguir descrito detecte, pelo menos, 10^3 células por litro nas águas superficiais, a sensibilidade de detecção nos efluentes de transformação de batata e de esgotos deverá ser bastante inferior. Por isso, recomenda-se que se testem os efluentes depois de quaisquer tratamentos de purificação (por exemplo, sedimentação ou filtração), durante os quais os níveis populacionais de bactérias saprófitas diminuam. Devem considerar-se as limitações em termos de sensibilidade do esquema de ensaio, ao avaliar a fiabilidade de eventuais resultados negativos obtidos. Embora este esquema tenha sido usado com êxito em prospecções para determinar a presença ou ausência do patógeno em águas superficiais, devem reconhecer-se as limitações do seu uso em prospecções semelhantes de efluentes de transformação de batata ou de esgotos.

2.1. Preparação da amostra

Nota:

- A detecção de *R. solanacearum* em águas superficiais é mais fiável no final da Primavera, no Verão e no Outono, quando a temperatura da água é superior a 15 °C.
- a realização de amostragens repetidas em diferentes momentos do período mencionado anteriormente em pontos de amostragem designados aumentará a fiabilidade da detecção pela redução dos efeitos da variação climática.
- Ter em conta os efeitos das fortes precipitações e a geografia do curso de água, para evitar os efeitos de uma diluição exagerada, que poderão camuflar a presença do patógeno.
- Recolher amostras de águas superficiais na proximidade de plantas hospedeiras, caso estas existam.

2.1.1. Nos pontos de amostragem seleccionados, recolher amostras de água enchendo tubos ou frascos esterilizados e descartáveis, se possível, a uma profundidade superior a 30 cm e a menos de 2 m da margem. Para os efluentes da transformação de batata e de esgotos, recolher amostras no ponto de descarga dos efluentes. Recomenda-se que o volume das amostras não deverá ultrapassar os 500 ml por ponto de amostragem. Caso se prefiram amostras mais pequenas, é aconselhável recolher amostras, pelo menos, três vezes por ponto de amostragem, devendo cada amostra ser constituída por duas subamostras duplicadas de, pelo menos, 30 ml cada. Para prospecções mais intensivas, seleccionar pelo menos três pontos de amostragem por cada 3 km de curso de água e certificar-se de que são também recolhidas amostras dos afluentes que entram no curso de água.

2.1.2. Transportar as amostras refrigeradas (4-10 °C) e no escuro e testá-las no prazo de 24 horas.

2.1.3. Caso seja necessário, a fracção bacteriana pode ser concentrada por um dos seguintes métodos:

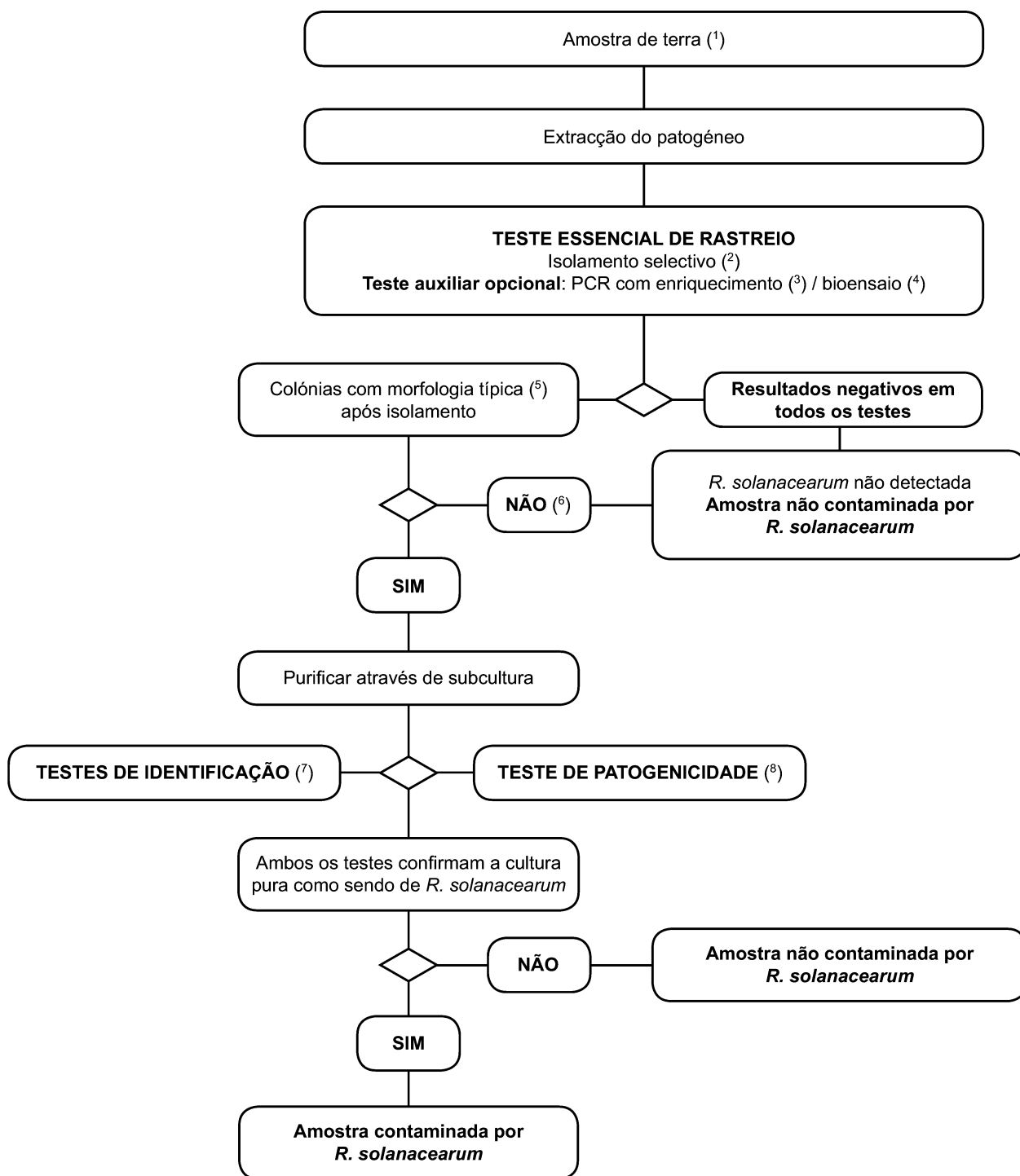
- a) Centrifugar subamostras de 30-50 ml a 10 000 g durante 10 minutos (ou a 7 000 g durante 15 minutos), de preferência a uma temperatura entre 4 e 10 °C, desprezar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em 1 ml de tampão de ressuspensão (apêndice 4).
- b) Filtração com membrana (dimensão mínima do poro de 0,45 µm), seguida de lavagem do filtro com 5-10 ml de tampão de ressuspensão e recuperação das suspensões resultantes da lavagem. Este método é adequado para volumes maiores de água contendo um reduzido número de saprófitas.

Em geral, não se aconselha a concentração para amostras de efluentes de transformação de batata ou de esgotos, dado que a existência de níveis populacionais mais elevados de bactérias saprófitas competidoras inibirá a detecção da *R. solanacearum*.

2.2. Ensaio

Ver fluxograma e descrição dos testes nos respectivos apêndices.

SECÇÃO V

1. Esquema para detecção e identificação de *R. solanacearum* no solo

- (¹) Ver ponto 2.1 da secção V para os procedimentos de amostragem recomendados.
- (²) O teste de isolamento selectivo é descrito na parte A, ponto 4, da secção VI.
- (³) Os métodos de PCR com enriquecimento são descritos na parte A, pontos 4.2 e 6, da secção VI.
- (⁴) O bioensaio é descrito na parte A, ponto 9, da secção VI.
- (⁵) A morfologia típica das colónias é descrita no ponto 3, alínea d), da secção II.
- (⁶) Poderá não ser possível isolar a bactéria devido à competição ou inibição por bactérias saprófitas. Caso se suspeite que a existência de elevados níveis populacionais de saprófitas afecta a fiabilidade do isolamento, repetir o isolamento após diluição da amostra em água esterilizada.
- (⁷) Obtém-se uma identificação fiável de culturas puras de presumíveis isolados de *R. solanacearum* através dos testes descritos na parte B da secção VI.
- (⁸) O teste de patogenicidade é descrito na parte C da secção VI.

2. Métodos de detecção e identificação de *R. solanacearum* no solo

Princípios

O esquema de detecção validado descrito nesta secção é aplicável à detecção do patógeno em amostras de solo, embora possa também ser usado para análise de amostras de resíduos sólidos de transformação de batata ou de lamas de depuração. Deve notar-se, porém, que estes métodos não são suficientemente sensíveis para garantir a detecção de populações baixas e/ou dispersas de modo irregular de *R. solanacearum* que poderão ocorrer em amostras naturalmente contaminadas desses substratos.

Devem considerar-se as limitações em termos de sensibilidade deste esquema de ensaio, ao avaliar a fiabilidade dos resultados negativos obtidos e também quando usado em prospecções para determinar a presença ou ausência do patógeno em solos ou em lamas. O teste mais fiável para detectar a presença do patógeno num campo consiste em plantar um hospedeiro susceptível e controlá-lo para detectar uma eventual infecção, mas, mesmo com este método, não serão detectados os baixos níveis de contaminação.

2.1. Preparação da amostra

2.1.1. A recolha de amostras de solo de um campo deve seguir os princípios comuns usados para a amostragem de nemátodos. Recolher 0,5-1 kg de solo por amostra de 60 locais por cada 0,3 ha, a uma profundidade de 10-20 cm (ou numa grelha de 7x7 metros). Caso se suspeite de presença do patógeno, aumentar o número de pontos de recolha para 120 por 0,3 ha. Manter as amostras a 12-15 °C antes do seu processamento. Para as amostras de resíduos provenientes da transformação de batata ou de lamas de depuração, recolher um total de 1 kg dos locais representativos do volume total dos resíduos e lamas a testar. Misturar bem cada uma das amostras antes de efectuar os testes.

2.1.2. Dispersar subamostras de 10-25 g de solos, resíduos sólidos de transformação de batata ou lamas num agitador rotativo (250 rpm) em 60-150 ml de tampão de extracção (apêndice 4) durante um período máximo de duas horas. Se necessário, pode auxiliar-se a dispersão mediante adição de 0,02 % de Tween-20 e de 10-20 g de cascalho esterilizados.

2.1.3. Manter a suspensão a 4 °C durante os testes.

2.2. Ensaio

Ver fluxograma e descrição dos testes nos respectivos apêndices.

SECÇÃO VI

PROTOCOLOS OPTIMIZADOS PARA DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *R. SOLANACEARUM*

A. Testes de diagnóstico e detecção

1. Teste de exsudação do caule

A presença de *R. solanacearum* em caules de batateira, tomateiro ou outras plantas hospedeiras com sintomas de murchidão pode ser avaliada através de um simples teste inicial: cortar o caule imediatamente acima do nível do solo. Suspender a superfície cortada num tubo de ensaio com água límpida. Passados alguns minutos, procurar observar uma exsudação bacteriana espontânea característica a partir dos feixes vasculares.

2. Detecção de grânulos de poli- β -hidroxibutirato

1. Preparar um esfregaço do exsudado bacteriano proveniente do tecido infectado ou de uma cultura de 48 horas em meio YPGA ou SPA (apêndice 2) numa lâmina de microscópio.
2. Preparar esfregaços de controlo positivo com uma estirpe de *R. solanacearum* Biovar 2 e, se necessário, um esfregaço de uma espécie reconhecidamente negativa no teste PHB como controlo negativo.
3. Deixar secar ao ar e, em seguida, passar rapidamente a parte inferior de cada lâmina à chama para fixar os esfregaços.
4. Corar a preparação com azul de Nilo ou negro de Sudão e observar ao microscópio de acordo com o procedimento a seguir descrito:

Teste de azul de Nilo

- a) Cobrir cada lâmina com uma solução aquosa a 1 % de azul de Nilo A e incubar durante 10 minutos a uma temperatura de 55 °C.
- b) Sacudir as gotas de solução corante. Lavar brevemente e com cuidado em água corrente. Retirar o excesso de água com papel absorvente.
- c) Cobrir o esfregaço com uma solução aquosa a 8 % de ácido acético e incubar durante um minuto à temperatura ambiente.
- d) Lavar brevemente e com cuidado em água corrente. Retirar o excesso de água com papel absorvente.
- e) Voltar a humedecer com uma gota de água e cobrir com uma lamela.
- f) Examinar o esfregaço corado coberto com uma gota de óleo de imersão em microscópio de epifluorescência a 450 nm, utilizando uma objectiva de imersão em óleo ou água e uma ampliação de 600-1 000.
- g) Os grânulos de PHB apresentam uma fluorescência laranja viva. Observar também com luz normal transmitida para verificar se os grânulos são intracelulares e se a morfologia das células é típica de *R. solanacearum*.

Teste do negro de Sudão

- a) Corar cada lâmina com uma solução a 0,3 % de negro de Sudão B em etanol a 70 % e incubar durante 10 minutos à temperatura ambiente.
- b) Sacudir as gotas de solução corante e lavar brevemente em água corrente, retirando o excesso de água com papel absorvente.
- c) Mergulhar as lâminas brevemente em xilol e secar sobre papel absorvente. *Cuidado! O xilol é um produto nocivo. Tomar as medidas de segurança necessárias e trabalhar em "hotte".*
- d) Corar as lâminas com uma solução aquosa a 0,5 % (p/v) de safranina e incubar durante 10 segundos à temperatura ambiente. *Cuidado! A safranina é um produto nocivo. Tomar as medidas de segurança necessárias e trabalhar em "hotte".*
- e) Lavar com cuidado em água corrente, secar em papel absorvente e cobrir com uma lamela.
- f) Examinar os esfregaços corados cobertos com óleo de imersão em microscópio com luz transmitida e com uma ampliação de 1 000, utilizando uma objectiva de imersão em óleo.
- g) Os grânulos de PHB em células de *R. solanacearum* apresentam uma coloração azul negra e as paredes celulares apresentam uma coloração rosa.

3. Testes serológicos de aglutinação

A melhor forma de observar a aglutinação de células de *R. solanacearum* em exsudado bacteriano ou extractos de tecido sintomático é mediante a utilização de anticorpos marcados validados (ver apêndice 3), utilizando marcadores corados adequados como, por exemplo, células de *Staphylococcus aureus* ou partículas de látex coradas. Em caso de utilização de material disponível no mercado (ver apêndice 3), seguir as instruções do fabricante. Caso contrário, aplicar o procedimento seguinte:

- a) Misturar gotas de uma suspensão de anticorpos marcados e exsudado bacteriano (aproximadamente 5 µl de cada) nos poços de lâminas de poços múltiplos.
- b) Preparar controlos positivos e negativos utilizando suspensões de *R. solanacearum* Biovar 2 e de uma estirpe heteróloga.
- c) Depois de homogeneizar com cuidado durante 15 segundos, observar a produção de aglutinação nas amostras positivas.

4. Isolamento selectivo

4.1. Diluição em placas com meio selectivo

Nota: Antes de utilizar este método pela primeira vez, efectuar testes preliminares para garantir a detecção reprodutível de 10^3 a 10^4 unidades formadoras de colónias (ufc) de *R. solanacearum* por ml adicionadas a extractos de amostras que apresentaram anteriormente resultados negativos.

Utilizar um meio selectivo devidamente validado, como o SMSA (alterado por Elphinstone *et al.*, 1996, ver apêndice 2).

É necessário estar atento de forma a diferenciar *R. solanacearum* de outras bactérias que possam desenvolver colónias no meio. Além disso, as colónias de *R. solanacearum* podem apresentar morfologia atípica em caso de sobrepopulação das placas ou se estiverem também presentes bactérias antagonistas. Se se suspeitar de efeitos de competição ou antagonismo, a amostra deve ser reanalisada utilizando um teste diferente.

Pode esperar-se a sensibilidade de detecção mais elevada com este método quando se utilizam extractos de amostras recentemente preparados. No entanto, o método pode também ser aplicado a extractos que tenham sido armazenados em glicérol a uma temperatura compreendida entre -68 e -86 °C.

Como controlos positivos, preparar diluições decimais de uma suspensão de 10^6 ufc por ml de uma estirpe virulenta de *R. solanacearum* Biovar 2 (por exemplo, NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857). Para evitar qualquer possibilidade de contaminação, os controlos positivos deverão ser sempre preparados à parte das amostras a testar.

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

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

4.1.1. Aplicar uma técnica de diluição em placas adequada, a fim de garantir a diluição de eventuais populações saprófitas formadoras de colónias. Espalhar, por placa, 50-100 μ l de extracto de amostra por cada diluição.

4.1.2. Incubar as placas a 28 °C. Observar as placas após 48 horas e em seguida diariamente durante um período de até 6 dias. As colónias típicas de *R. solanacearum* em SMSA apresentam, de início, uma cor branca leitosa, são achatadas, irregulares e fluidas e após 3 dias de incubação o centro adquire uma coloração rosa a vermelho-vivo com estrias ou espirais internas (ver sítio web <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Nota: Neste meio formam-se por vezes colónias atípicas de *R. solanacearum*, que podem ser pequenas, redondas, completamente vermelhas e não fluidas ou apenas parcialmente fluidas e, portanto, difíceis de distinguir de bactérias saprófitas formadoras de colónias.

4.1.3. Purificar as presumíveis colónias de *R. solanacearum* por reticulado ou diluição em placas num meio nutritivo geral a fim de obter colónias isoladas (ver apêndice 2).

4.1.4. Armazenar as culturas a curto prazo em água desionizada esterilizada (pH 6-8) à temperatura ambiente, na obscuridade, ou a longo prazo num meio crioprotector adequado entre -68 e -86 °C ou liofilizadas.

4.1.5. Identificar culturas de presumíveis isolados de *R. solanacearum* (ver parte B da secção VI) e efectuar um teste de patogenicidade (ver parte C da secção VI).

Interpretação dos resultados da diluição em placas com meio selectivo

O teste de diluição em placas com meio selectivo é negativo se não for observada nenhuma colónia bacteriana ao fim de seis dias ou se não forem encontradas colónias presumivelmente características de *R. solanacearum*, desde que não se suspeite de inibição resultante de concorrência ou antagonismo de outras bactérias e que sejam detectadas colónias características de *R. solanacearum* nos controlos positivos.

O teste de diluição em placas com meio selectivo é positivo se forem isoladas colónias de presumíveis isolados de *R. solanacearum*.

4.2. Operação de enriquecimento

Utilizar um meio de enriquecimento validado, como o caldo Wilbrink modificado (ver apêndice 2).

Este procedimento pode ser utilizado para aumentar selectivamente as populações de *R. solanacearum* nos extractos de amostras e aumentar a sensibilidade de detecção. Este procedimento também dilui de forma eficaz os inibidores da reacção da PCR (1:100). Importa referir, no entanto, que o enriquecimento de *R. solanacearum* pode ser infrutífero devido à competição ou ao antagonismo de organismos saprófitas, que em muitos casos são enriquecidos simultaneamente. Por esta razão, o isolamento de *R. solanacearum* a partir de meios líquidos de cultura enriquecidos pode ser difícil. Além disso, como as populações de saprófitas serologicamente afins podem aumentar, recomenda-se a utilização de anticorpos monoclonais específicos em vez de anticorpos policlonais quando se utilize o teste ELISA.

- 4.2.1. Para o teste PCR com enriquecimento, transferir 100 µl de extracto de amostra para 10 ml de meio líquido de enriquecimento (apêndice 2) previamente separado em alíquotas para tubos ou frascos isentos de ADN. Para o teste ELISA com enriquecimento podem utilizar-se diluições mais concentradas do extracto da amostra (por exemplo 100 µl em 1,0 ml de caldo de enriquecimento).
- 4.2.2. Incubar durante 72 horas a uma temperatura compreendida entre os 27 e 30 °C em cultura agitada ou estática, mantendo as tampas dos recipientes apertadas frouxamente para permitir o arejamento.
- 4.2.3. Misturar bem antes de utilizar nos testes ELISA ou PCR.
- 4.2.4. Tratar o meio líquido enriquecido de modo idêntico ao da(s) amostra(s) nos testes acima referidos.

Nota: Se for de prever a inibição do enriquecimento de *R. solanacearum* devido à existência de grandes populações de certas bactérias saprófitas competidoras, poderão conseguir-se melhores resultados com o enriquecimento dos extractos de amostras antes de se efectuar uma centrifugação ou outros processos de concentração.

5. Teste IF

Princípio

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

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

Nota: Utilizar anticorpos validados de *R. solanacearum* (ver sítio web <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Recomenda-se a determinação do título para cada novo lote de anticorpos. O título é definido como a diluição mais elevada para a qual se verifica uma reacção óptima ao testar uma suspensão contendo 10^5 a 10^6 células por ml de uma estirpe homóloga de *R. solanacearum* e recorrendo a um conjugado de isotiocianato de fluoresceína (FITC), de acordo com as recomendações do fabricante. Todos os anti-soros policlonais validados têm um título de IF de 1:2 000 no mínimo. Durante o teste os anticorpos devem ser utilizados em diluições de trabalho próximas do título ou no seu valor exacto.

O teste deve ser realizado com extractos de amostras recentemente preparados. Se necessário, pode ser executado com sucesso com extractos armazenados entre - 68 e - 86 °C e conservados em glicerol. O glicerol pode ser retirado da amostra através da adição de 1 ml de tampão de ressuspensão (apêndice 4), nova centrifugação durante 15 minutos a 7 000 g e ressuspensão num volume igual de tampão de ressuspensão. Este procedimento é frequentemente desnecessário, em especial se as lâminas forem fixadas à chama.

Preparar lâminas de controlo positivo em separado com uma estirpe homóloga, ou qualquer outra estirpe de referência de *R. solanacearum*, suspensa em extracto de batata, tal como especificado na parte B do apêndice 3 ou opcionalmente em tampão.

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

Como controlos negativos, podem ser utilizadas alíquotas de extracto de amostra que se tenham anteriormente revelado negativas relativamente à presença de *R. solanacearum*.

Os materiais normalizados de controlo positivo e negativo que podem ser utilizados neste teste são referidos no apêndice 3.

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

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

5.1. Preparar as lâminas através de um dos seguintes procedimentos

- i) Para sedimentos com relativamente pouco amido:

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

- ii) Para outros sedimentos:

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

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

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

5.3. Procedimento IF

- i) De acordo com a preparação da lâmina descrita na alínea i) do ponto 5.1:

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

- ii) De acordo com a preparação da lâmina descrita na alínea ii) do ponto 5.1:

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

Figura 1. Preparação da lâmina de acordo com os pontos 5.1, alínea i), e 5.3, alínea i)

		Diluições do sedimento ressuspense						
		1/100	1/1	1/1	1/1	1/1	<input type="checkbox"/> Diluição do sedimento ressuspense	
		(T = título)	T/2	T/4	T/2	T	2T	<input type="checkbox"/> Diluições 1/2 do anti-soro/anticorpo
Amostra 1		● 1	● 2	● 3	● 4	● 5		
Duplicado da amostra 1 ou amostra 2		● 6	● 7	● 8	● 9	● 10		

Figura 2. Preparação da lâmina de acordo com os pontos 5.1, alínea ii), e 5.3, alínea ii)

		Diluição de trabalho do anti-soro/anticorpo					
		1/1	1/10	1/100	Vazio	Vazio	<input type="checkbox"/> Diluição decimal do sedimento ressuspense
Amostra 1		● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Duplicado da amostra 1 ou amostra 2		● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

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

O procedimento seguinte deverá ser efectuado na ausência de instruções específicas dos fornecedores dos anticorpos:

- 5.3.2. Incubar as lâminas sobre papel humedecido durante 30 minutos à temperatura ambiente (18 a 25 °C) numa caixa opaca fechada.
- 5.3.3. Sacudir as gotículas de cada lâmina e lavar cuidadosamente com tampão IF. Lavar por submersão durante 5 minutos em tampão IF-Tween (apêndice 4) e subsequentemente em tampão IF. Evitar a transferência de aerossóis ou de gotículas, o que poderia dar origem a uma contaminação cruzada. Eliminar cuidadosamente a humidade em excesso, secando suavemente com papel absorvente.
- 5.3.4. Dispor as lâminas sobre papel humedecido. Cobrir os poços a testar com a diluição do conjugado FITC utilizada para determinar o título. O volume de conjugado adicionado aos poços deve ser idêntico ao volume de anticorpo utilizado.
- 5.3.5. Incubar as lâminas sobre papel humedecido durante 30 minutos à temperatura ambiente (18 a 25 °C) numa caixa opaca fechada.
- 5.3.6. Sacudir da lâmina as gotículas de conjugado. Lavar como anteriormente (ponto 5.3.3).

Retirar cuidadosamente o excesso de humidade.

- 5.3.7. Pipetar para cada poço 5-10 µl de uma solução de tampão fosfato 0,1 M com glicerol (apêndice 4), ou de um líquido de montagem disponível no mercado que evite a perda rápida de fluorescência, e cobrir com uma lamela.
- 5.4. Leitura do teste IF:

- 5.4.1 Examinar as lâminas do teste num microscópio de epifluorescência, com filtros adequados para excitação do FITC, utilizando uma lente de imersão em óleo ou água, com uma ampliação de 500-1 000. Examinar os poços ao longo de dois diâmetros perpendiculares e à volta do perímetro. Para amostras que não revelem células, ou cujo número seja reduzido, observar, pelo menos, 40 campos do microscópio.

Observar primeiro a lâmina do controlo positivo. As células devem apresentar-se com uma fluorescência brilhante e completamente coradas no título do anticorpo ou diluição de trabalho determinados. O teste IF (parte A, ponto 5, da secção VI) deve ser repetido se a coloração for aberrante.

- 5.4.2. Procurar células fluorescentes brilhantes com a morfologia característica de *R. solanacearum* nos poços em estudo das lâminas a testar (ver <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). A intensidade de fluorescência deve ser equivalente à da estirpe do controlo positivo, para a mesma diluição do anticorpo. As células com coloração incompleta ou com fluorescência fraca não devem ser consideradas.

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

- 5.4.3. Há vários problemas inerentes à especificidade do teste de imunofluorescência. Em sedimentos de cones de hilo e de segmentos de caule da batateira, é possível a ocorrência de populações de células fluorescentes com morfologia atípica e reacções cruzadas de bactérias saprófitas com dimensões e morfologia semelhantes a *R. solanacearum*.
- 5.4.4. Considerar apenas células fluorescentes com dimensões e morfologia típicas no título ou na diluição de trabalho dos anticorpos, tal como descrito em 5.3.

5.4.5. Interpretação da leitura do teste IF:

- i) Se forem detectadas células fluorescentes brilhantes e com a morfologia característica, determinar o número médio de células típicas por cada campo do microscópio e calcular o número de células típicas por ml de sedimento ressuspenso (apêndice 5).

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

- ii) A leitura do teste IF revela um resultado negativo para amostras com menos de 5×10^3 células por ml de sedimento ressuspenso sendo a amostra considerada negativa. A realização de outros testes não é obrigatória.

6. Testes PCR

Princípios

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

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

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

Utilizar os reagentes e protocolos PCR validados (ver apêndice 6). Seleccionar, de preferência, um método que disponha de um controlo interno.

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

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

Devem ser incluídos no teste PCR os seguintes controlos negativos:

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

Devem ser incluídos os seguintes controlos positivos:

- Alíquotas de sedimentos ressuspensos às quais se adicionou *R. solanacearum* (ver preparação na parte B do apêndice 3);
- Uma suspensão em água contendo 10^6 células por ml de um isolado virulento de *R. solanacearum* (por exemplo, NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; ver parte B do apêndice 3).
- Se possível, utilizar também ADN extraído de amostras positivas ao realizar o teste PCR.

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

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

Os materiais normalizados de controlo positivo e negativo que podem ser utilizados para este teste estão mencionados no apêndice 3.

6.1. Métodos de purificação do ADN

Utilizar amostras de controlo positivo e negativo, tal como acima descrito (ver apêndice 3).

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

Existe uma variedade de métodos para a purificação de ADN-alvo a partir de amostras de substratos complexos, removendo, deste modo, os inibidores da PCR e outras reacções enzimáticas e concentrando o ADN-alvo no extracto de amostra. O método seguinte foi optimizado para utilização com os métodos PCR validados referidos no apêndice 6.

a) Método de acordo com Pastrik (2000)

- 1) Pipetar 220 µl de tampão de lise (NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM [pH 8,0], EDTA 1 mM [pH 8,0]) para um tubo Eppendorf de 1,5 ml.
- 2) Adicionar 100 µl de extracto de amostra e colocar num bloco de aquecimento ou em banho-maria a 95 °C durante 10 minutos.
- 3) Colocar o tubo em gelo durante 5 minutos.
- 4) Adicionar 80 µl de solução concentrada de lisozima (50 mg de lisozima por ml em Tris HCl 10 mM, pH 8,0) e incubar a 37 °C durante 30 minutos.
- 5) Adicionar 220 µl de solução A Easy DNA[®] (Invitrogen), misturar bem em vórtice e incubar a 65 °C durante 30 minutos.
- 6) Adicionar 100 µl de solução B Easy DNA[®] (Invitrogen), agitar vigorosamente em vórtice até que o precipitado se desloque livremente no tubo e a amostra esteja uniformemente viscosa.
- 7) Adicionar 500 µl de clorofórmio e agitar em vórtice até que a viscosidade diminua e a mistura se torne homogénea.
- 8) Centrifugar a 15 000 g durante 20 minutos a 4 °C para separar as fases e formar a interfase.
- 9) Transferir a fase superior para um novo tubo Eppendorf.
- 10) Adicionar 1 ml de etanol a 100 % (- 20 °C), agitar brevemente em vórtice e incubar no gelo durante 10 minutos.
- 11) Centrifugar a 15 000 g durante 20 minutos a 4 °C e remover o etanol do sedimento.
- 12) Adicionar 500 µl de etanol a 80 % (- 20 °C) e misturar invertendo o tubo.
- 13) Centrifugar a 15 000 g durante 10 minutos a 4 °C, guardar o sedimento e remover o etanol.
- 14) Deixar secar o sedimento ao ar ou em "DNA speed vac".
- 15) Ressuspender o sedimento em 100 µl de água ultra pura (UPW) esterilizada e deixar à temperatura ambiente durante, pelo menos, 20 minutos.
- 16) Armazenar a - 20 °C até ser necessário para a realização da PCR.
- 17) Centrifugar qualquer precipitado branco até que este se deposite no fundo e utilizar 5 µl do sobrenadante contendo ADN para a PCR.

b) Outros métodos

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

6.2. PCR

- 6.2.1. Preparar as amostras a testar e controlos para a PCR em conformidade com os protocolos validados (parte A, ponto 6, da secção VI). Preparar uma diluição decimal de extracto de ADN da amostra (1:10 em UPW).
- 6.2.2. Preparar a mistura adequada de reacção da PCR num ambiente isento de contaminação, de acordo com os protocolos publicados (apêndice 6). Quando possível, recomenda-se a utilização de um protocolo PCR multiplex que incorpore também um controlo interno da PCR.
- 6.2.3. Adicionar 2-5 µl de extracto de ADN à mistura de reacção da PCR de forma a obter um volume final de 25 µl em tubos PCR esterilizados de acordo com os protocolos PCR (ver apêndice 6).
- 6.2.4. Incorporar uma amostra de controlo negativa contendo apenas mistura de reacção da PCR e adicionar a mesma fonte de UPW utilizada na mistura da PCR em vez da amostra.
- 6.2.5. Colocar os tubos no mesmo termociclador que foi utilizado nos testes preliminares e iniciar o programa devidamente optimizado da PCR (apêndice 6).

6.3. Análise do produto da PCR

- 6.3.1. Proceder à electroforese em gel de agarose dos fragmentos amplificados pela PCR. Correr, pelo menos, 12 µl de mistura de reacção contendo o ADN amplificado de cada uma das amostras, misturados com 3 µl de tampão de carregamento (apêndice 6) em géis de agarose a 2,0 % (p/v) em tampão de tris acetato-EDTA (TAE) (apêndice 6) a 5-8 V por cm. Utilizar um marcador de ADN adequado, por exemplo, "100 bp ladder".
- 6.3.2. Revelar as bandas de ADN através de coloração em brometo de etídio (0,5 mg por l) durante 30-60 minutos, tomando as **precauções adequadas para manusear este agente mutagénico**.
- 6.3.3. Observar o gel corado num transiluminador com UV de ondas curtas ($\lambda = 302$ nm) para detecção de produtos amplificados da PCR de tamanho esperado (apêndice 6) e documentar.
- 6.3.4. Para todas as novas detecções/situações, verificar a autenticidade do fragmento amplificado pela PCR através da realização de análise de restrição enzimática numa amostra do ADN amplificado restante, por incubação com uma enzima de restrição e um tampão adequados à temperatura e com duração óptimas (ver apêndice 6). Proceder, tal como anteriormente, à electroforese em gel de agarose dos fragmentos digeridos e observar o padrão dos fragmentos de restrição característico num transiluminador com UV, após coloração com brometo de etídio, e comparar com o controlo positivo não digerido e digerido.

Interpretação do resultado do teste PCR

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

O teste PCR é considerado positivo caso seja detectado o fragmento amplificado pela PCR específico para *R. solanacearum* de tamanho e padrão de restrição esperados (quando exigido), desde que não seja amplificado a partir de nenhuma das amostras de controlo negativo. A confirmação fiável de um resultado positivo pode também ser obtida mediante a repetição do teste com um segundo conjunto de iniciadores da PCR (apêndice 6).

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

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

7. Teste FISH

Princípio

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

Nota: Utilizar sondas validadas específicas para *R. solanacearum* (apêndice 7). O teste preliminar com este método deveria permitir a detecção reprodutível de, pelo menos, 10^3 a 10^4 células de *R. solanacearum* por ml adicionadas a extractos de amostras que se revelaram negativos.

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

Como controlos negativos, utilizar alíquotas de extracto de amostra que tenha anteriormente sido testado com resultado negativo para *R. solanacearum*.

Como controlos positivos preparar suspensões contendo 10^5 a, 10^6 células de *R. solanacearum* Biovar 2 por ml (por exemplo, estirpe NCPPB 41 56 = PD 2762 = CFBP 3857, ver apêndice 3) em tampão fosfato (PB) 0,01 M, a partir de uma cultura com 3 a 5 dias. Preparar lâminas de controlo positivo em separado com a estirpe homóloga, ou qualquer outra estirpe de referência de *R. solanacearum*, suspensa em extracto de batata, tal como especificado na parte B do apêndice 3.

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

Os materiais normalizados de controlo positivo e negativo que podem ser utilizados para este teste são enumerados na parte A do apêndice 3.

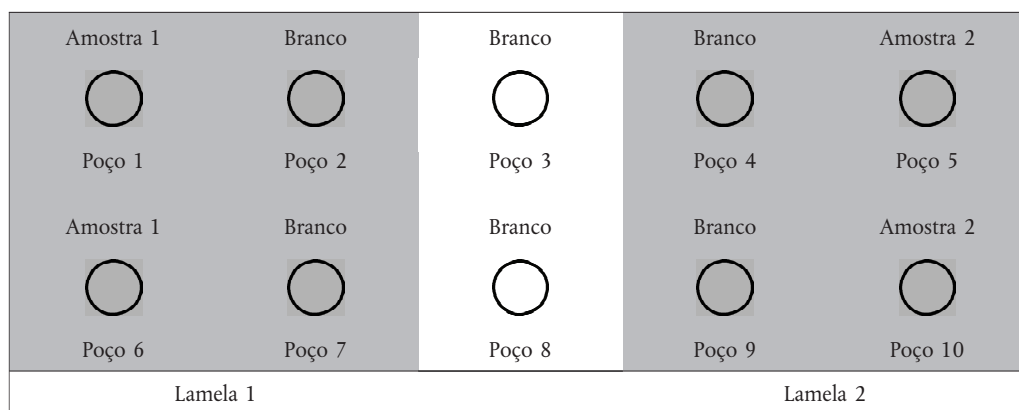
Testar o material de controlo de forma idêntica à da(s) amostra(s).

7.1. Fixação do extracto de batata

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

- 7.1.1. Preparar a solução fixadora (ver apêndice 7).
- 7.1.2. Pipetar 100 µl de cada extracto de amostra para um tubo Eppendorf e centrifugar durante 7 minutos a 7 000 g.
- 7.1.3. Remover o sobrenadante e dissolver o sedimento em 200 µl de fixador preparado há menos de 24 horas. Agitar em vórtice e incubar durante 1 hora no frigorífico.
- 7.1.4. Centrifugar durante 7 minutos a 7 000 g, remover o sobrenadante e ressuspender o sedimento em 75 µl de PB 0,01M (ver apêndice 7).
- 7.1.5. Colocar 16 µl das suspensões fixadas numa lâmina multiteste limpa, tal como demonstrado na figura 7.1. Aplicar duas amostras não diluídas diferentes por lâmina e utilizar 10 µl para obter uma diluição de 1:100 (em PB 0,01 M). A solução de amostra restante (49 µl) pode ser armazenada a - 20 °C após adição de 1 volume de etanol a 96 %. Caso o teste FISH exija uma repetição, remover o etanol por centrifugação e adicionar igual volume de PB 0,01 M (agitar em vórtice).

Figura 7.1 Configuração para a lâmina FISH



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

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

7.2. Hibridação

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

7.2.2. Preparar uma câmara de incubação húmida, cobrindo o fundo de uma caixa hermética com papel absorvente ou de filtro embebido em 1x "hybmix" (apêndice 7). Pré-incubar a caixa na estufa de hibridação a 45 °C durante, pelo menos, 10 minutos.

7.2.3. Juntar 10 µl de solução de hibridação (apêndice 7) a 8 poços (poços 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 e 10; ver figura 7.1) de cada lâmina, deixando vazios os dois poços centrais (3 e 8).

7.2.4. Cobrir os primeiros e os últimos 4 poços com lamelas (24 x 24 mm) sem retenção de ar. Colocar as lâminas na câmara húmida pré-aquecida e hibridar durante 5 horas na estufa a 45 °C, na obscuridade.

7.2.5. Preparar 3 copos contendo 1 l de água Milli Q (grau molecular), 1 l de 1x "hybmix" (334 ml 3x "hybmix" e 666 ml água Milli Q) e 1 l de 1/8x de "hybmix" (42 ml 3x "hybmix" e 958 ml água Milli Q). Pré-incubar cada um deles em banho-maria a 45 °C.

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

7.2.7. Remover as sondas em excesso por incubação durante 15 minutos no recipiente com 1x "hybmix" a 45 °C.

7.2.8. Transferir o porta-lâminas para uma solução de lavagem com 1/8 de "hybmix" e incubar durante mais 15 minutos.

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

7.3. Leitura do teste FISH

7.3.1. Observar imediatamente as lâminas com um microscópio equipado para microscopia de epifluorescência, sob lente de imersão em óleo, a uma ampliação de 630 ou 1 000 ×. Com um filtro indicado para isotiocianato de fluoresceína (FITC), as células eubacterianas (incluindo a maior parte das células gram-negativas) presentes na amostra mostram uma coloração verde fluorescente. Com um filtro para isotiocianato-5-tetrametilrodamina, as células de *R. solanacearum* coradas com Cy3 revelam-se vermelho fluorescente. Comparar a morfologia das células com a dos controlos positivos. As células devem apresentar-se com uma fluorescência brilhante e completamente coradas. O teste FISH (parte A, ponto 7, da secção VI) deve ser repetido se a coloração for aberrante. Examinar os poços ao longo de dois diâmetros perpendiculares e à volta do perímetro. Para amostras que não revelem células, ou cujo número seja reduzido, observar, pelo menos, 40 campos do microscópio.

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

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

- 7.3.4. Há vários problemas inerentes à especificidade do teste FISH. Em sedimentos de cones de hilo e de segmentos de caule da batateira, é provável a ocorrência de populações de células fluorescentes com morfologia atípica e reações cruzadas de bactérias saprófitas com dimensões e morfologia semelhantes às de *R. solanacearum*, apesar de este fenómeno ser menos frequente do que no teste IF.
- 7.3.5. Considerar unicamente as células fluorescentes de dimensões e morfologia típicas.
- 7.3.6. Interpretação do resultado do teste FISH
- Obtêm-se resultados válidos para o teste FISH quando se observarem, com um filtro para FITC, células brilhantes com fluorescência verde de dimensões e morfologia típicas de *R. solanacearum* e, com o filtro para rodamina, células brilhantes com fluorescência vermelha em todos os controlos positivos, as quais deverão estar ausentes em todos os controlos negativos. Se forem detectadas células fluorescentes brilhantes e com a morfologia característica, determinar o número médio de células típicas por cada campo do microscópio e calcular o número de células típicas por ml de sedimento ressuspensão (apêndice 4). As amostras com, pelo menos, 5×10^3 células típicas por ml de sedimento ressuspensão são consideradas como potencialmente contaminadas. A realização de outros testes é obrigatória. As amostras com menos de 5×10^3 células típicas por ml de sedimento ressuspensão são consideradas negativas.
 - O teste FISH é negativo se, com um filtro para rodamina, não se observarem células brilhantes com fluorescência vermelha e dimensões e morfologia típicas de *R. solanacearum*, e sejam observadas células típicas brilhantes com fluorescência vermelha nas preparações de controlo positivo.

8. Testes ELISA

Princípio

O teste ELISA só pode ser utilizado como teste opcional em complemento de testes IF, PCR ou FISH, devido à sensibilidade relativamente baixa deste teste. Quando se utiliza o teste DAS ELISA, é obrigatório efectuar o enriquecimento e utilizar anticorpos monoclonais (ver sítio web <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Pode ser útil efectuar um enriquecimento das amostras antes de utilizar o teste ELISA a fim de aumentar a sensibilidade deste teste, mas esse enriquecimento pode ser infrutífero devido à concorrência de outros organismos presentes na amostra.

Nota: Utilizar anticorpos validados de *R. solanacearum* (ver sítio web <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Recomenda-se a determinação do título para cada novo lote de anticorpos. O título é definido como a diluição mais elevada para a qual se verifica uma reacção óptima ao testar uma suspensão contendo 10^5 a 10^6 células por ml da estirpe homóloga de *R. solanacearum* e recorrendo a conjugados de anticorpos secundários adequados, de acordo com as recomendações do fabricante. Durante os testes, os anticorpos devem ser utilizados em diluições de trabalho próximas ou no título da formulação comercial.

Determinar o título dos anticorpos com uma suspensão de 10^5 a 10^6 células por ml da estirpe homóloga de *R. solanacearum*.

Incluir como controlo negativo um extracto de amostra que tenha anteriormente sido testado com resultado negativo para *R. solanacearum* e uma suspensão de uma bactéria que não origine reacção cruzada em tampão fosfato salino (PBS).

Como controlo positivo, utilizar alíquotas de extracto de amostra que tenha anteriormente sido testado com resultado negativo, misturadas com 10^3 a 10^4 células por ml de *R. solanacearum* Biovar 2 (por exemplo estirpe NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857, ver partes A e B do apêndice 2). Para a comparação dos resultados de cada placa, utilizar uma suspensão padrão de 10^5 a 10^6 células de *R. solanacearum* por ml em PBS. Assegurar-se de que os controlos positivos estão bem separados da(s) amostra(s) em estudo, na microplaca.

Os materiais normalizados de controlo positivo e negativo que podem ser utilizados neste teste são descritos na parte A do apêndice 3.

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

Foram validados dois protocolos ELISA.

- Teste ELISA indirecto (Robinson Smith *et al.*, 1995)
 - Utilizar alíquotas de 100-200 μ l de extracto de amostra. (O aquecimento a 100 °C durante 4 minutos em banho-maria ou num bloco de aquecimento pode, nalguns casos, reduzir os resultados não específicos).
 - Adicionar um volume igual de tampão de revestimento 2 x (apêndice 4) e agitar em vórtice.
 - Colocar alíquotas de 100 μ l em pelo menos dois dos poços de uma microplaca (por exemplo Nunc-Polysorp ou equivalente) e incubar durante 1 hora a 37 °C ou durante a noite a uma temperatura de 4 °C.

- 4) Retirar os extractos dos poços. Lavar os poços três vezes com PBS-Tween (apêndice 4), deixando a última solução de lavagem dentro dos poços durante, pelo menos, 5 minutos.
- 5) Preparar uma diluição adequada de anticorpos contra *R. solanacearum* em tampão de bloqueio (apêndice 4). Para anticorpos comerciais validados, utilizar as diluições recomendadas (geralmente uma concentração duas vezes superior ao título).
- 6) Adicionar 100 µl a cada poço e incubar durante 1 hora a 37 °C.
- 7) Retirar a solução de anticorpos dos poços e lavar como anteriormente (ponto 4).
- 8) Preparar uma diluição adequada de conjugado anticorpo secundário - fosfatase alcalina em tampão de bloqueio. Adicionar 100 µl a cada poço e incubar durante 1 hora a 37 °C.
- 9) Retirar o anticorpo conjugado dos poços e lavar como anteriormente (ponto 4).
- 10) Adicionar 100 µl de solução de substrato de fosfatase alcalina (apêndice 4) a cada poço. Incubar na obscuridade à temperatura ambiente e ler a absorvância a 405 nm a intervalos regulares durante 90 minutos.

b) DASI ELISA

- 1) Preparar uma diluição adequada de imunoglobulinas policlonais anti-*R. solanacearum* em tampão de revestimento, pH 9,6 (apêndice 4). Adicionar 200 µl a cada poço. Incubar a 37 °C durante 4-5 horas ou a 4 °C durante 16 horas.
- 2) Lavar os poços três vezes com PBS-Tween (apêndice 4).

Adicionar 190 µl de extracto de amostra em, pelo menos, dois poços. Adicionar também controlos positivos e negativos em dois poços de cada placa. Incubar durante 16 horas a 4 °C.

- 3) Lavar os poços três vezes com PBS-Tween (apêndice 4).
- 4) Preparar uma diluição adequada de anticorpos monoclonais específicos contra *R. solanacearum* em PBS (apêndice 4) que contenha também 0,5 % de albumina de soro de bovino (BSA) e adicionar 190 µl a cada poço. Incubar a 37 °C durante 2 horas.
- 5) Lavar os poços três vezes com PBS-Tween (apêndice 4).
- 6) Preparar uma diluição adequada de imunoglobulinas anti-rato conjugadas com fosfatase alcalina em PBS. Adicionar 190 µl a cada poço. Incubar a 37 °C durante 2 horas.
- 7) Lavar os poços três vezes com PBS-Tween (apêndice 4).
- 8) Preparar uma solução de substrato de fosfatase alcalina que contenha 1 mg de fosfato de p-nitrofenilo por ml de tampão de substrato (apêndice 4). Adicionar 200 µl a cada poço. Incubar na obscuridade à temperatura ambiente e ler a absorvância a 40 nm a intervalos regulares durante 90 minutos.

Interpretação do resultado do teste ELISA

O teste ELISA é negativo se a média das leituras da densidade óptica (DO) dos poços de amostras duplicadas for < 2x DO do poço de controlo negativo do extracto de amostra, desde que as DO dos controlos positivos sejam todas superiores a 1,0 (após 90 minutos de incubação com o substrato) e sejam superiores ao dobro da DO obtida para os extractos de amostras negativas.

O teste ELISA é positivo se a DO média dos poços de amostras duplicadas for > 2x DO do poço de extracto de amostra negativa, desde que as DO de todos os poços de controlo negativo sejam < 2x as DO dos poços de controlo positivo.

Uma leitura ELISA negativa nos poços de controlo positivo indica que o teste não foi efectuado correctamente ou que ocorreram inibições. Uma leitura ELISA positiva nos poços de controlo negativo indica que ocorreu contaminação cruzada ou uma ligação não específica de anticorpos.

9. Bioensaio

Nota: Um teste preliminar com este método deveria permitir a detecção reprodutível de 10^3 a 10^4 unidades formadoras de colónias de *R. solanacearum* por ml adicionadas a amostras de extractos para as quais se obtiveram anteriormente resultados negativos (para a preparação, ver apêndice 3).

Pode esperar-se a sensibilidade de detecção mais elevada quando se utiliza uma amostra de extracto recentemente preparada e condições de crescimento óptimas. No entanto, o método pode ser aplicado com sucesso a extractos que tenham sido armazenados em glicerol a uma temperatura compreendida entre -68 e -86 °C.

O protocolo seguinte tem por base Janse (1988):

- 9.1. Para cada amostra, utilizar 10 plantas de uma cultivar susceptível de tomateiro (por exemplo Moneymaker ou cultivar com susceptibilidade equivalente, determinada pelo laboratório) no estágio de três folhas verdadeiras. Para os pormenores de cultivo, ver apêndice 8. Em alternativa, utilizar beringelas (por exemplo cultivar Black Beauty ou cultivares com susceptibilidade equivalente), mas apenas plantas que se encontrem no estágio fenológico de duas a três folhas, até que a terceira folha verdadeira esteja completamente expandida. Tem-se observado que os sintomas são menos graves e se desenvolvem mais lentamente na beringela. Recomenda-se, por conseguinte, a utilização de plântulas de tomateiro, sempre que possível.

- 9.2. Distribuir 100 µl de extracto de amostra pelas plantas.

- 9.2.1. Inoculação por injeção

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

- 9.2.2. Inoculação por fenda

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

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

Selar o corte com vaselina esterilizada aplicada com uma seringa.

- 9.3. Inocular, através da mesma técnica, 5 plântulas com uma suspensão aquosa de 10^5 a 10^6 células por ml preparada a partir de uma cultura de 48 horas de uma estirpe virulenta de *R. solanacearum* Biovar 2, como controlo positivo, e com tampão de ressuspensão (apêndice 4) como controlo negativo. Separar as plantas de controlo positivo e negativo das outras plantas, a fim de evitar contaminações cruzadas.
- 9.4. Deixar crescer as plantas em instalações de quarentena durante um período de até 4 semanas a uma temperatura de 25-30 °C e elevada humidade relativa, regando adequadamente para evitar o alagamento ou a murchidão por falta de água. Para evitar a contaminação, incubar as plantas de controlo positivo e as de controlo negativo em prateleiras claramente separadas numa estufa ou câmara de crescimento ou, caso existam limitações de espaço, garantir uma separação rigorosa. Se as plantas relativas a amostras diferentes tiverem de ser incubadas perto umas das outras, separá-las com as divisórias adequadas. Evitar contaminações cruzadas ao adubar, regar, inspecionar ou ao proceder a outras manipulações. É essencial manter as estufas ou as câmaras de crescimento isentas de pragas, visto que estas podem promover a transmissão da bactéria entre amostras.

Observar o desenvolvimento de sintomas de murchidão, epinastia, clorose e/ou nanismo.

- 9.5. Fazer isolamentos a partir das plantas infectadas (ponto 3 da secção II) e identificar culturas puras de presumíveis colónias de *R. solanacearum* (parte B da secção VI).
- 9.6. Caso não se observem sintomas após 3 semanas, efectuar um teste IF, PCR ou de isolamento numa amostra composta de secções de 1 cm do caule de cada uma das plantas inoculadas com os extractos das amostras, colhidas acima do local da inoculação. Se o teste for positivo, proceder à diluição em placas (ponto 4.1).
- 9.7. Identificar culturas puras de presumíveis colónias de *R. solanacearum* (parte B da secção VI).

Interpretação dos resultados do bioensaio

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

O bioensaio é negativo se as plantas inoculadas com os extractos das amostras não estiverem infectadas por *R. solanacearum* e se for detectada *R. solanacearum* nos controlos positivos.

O bioensaio é positivo se as plantas inoculadas com os extractos das amostras estiverem infectadas por *R. solanacearum*.

B. TESTES DE IDENTIFICAÇÃO

Identificar culturas puras de presumíveis isolados de *R. solanacearum*, utilizando, pelo menos, dois dos seguintes testes baseados em princípios biológicos diferentes.

Incluir estirpes de referência conhecidas, sempre que adequado, para cada teste realizado (ver apêndice 3).

1. Testes nutricionais e enzimáticos

Determinar as seguintes características fenotípicas, que estão universalmente presentes ou ausentes em *R. solanacearum*, de acordo com os métodos de Lelliott e Stead (1987), Klement *et al.* (1990), Schaad (2001).

Teste	Resultado esperado
Produção de pigmento fluorescente	–
Grânulos de poli- β -hidroxibutirato	+
Teste de oxidação/fermentação (O/F)	O+/F–
Produção da catalase	+
Teste de oxidase de Kovac	+
Redução dos nitratos	+
Utilização de citrato	+
Crescimento a 40 °C	–
Crescimento em NaCl a 1 %	+
Crescimento em NaCl a 2 %	–
Produção de arginina di-hidrolase	–
Liquefacção da gelatina	–
Hidrólise do amido	–
Hidrólise da esculina	–
Produção de levana	–

2. Teste IF

- 2.1. Preparar uma suspensão com cerca de 10^6 células por ml em tampão IF (apêndice 4).
- 2.2. Preparar uma série de diluições a 1:2 de um anti-soro adequado (ver sítio *web* <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).
- 2.3. Aplicar o procedimento de IF (parte A, ponto 5, da secção VI).
- 2.4. Um resultado positivo no teste IF é alcançado se o título IF da cultura for equivalente ao do controlo positivo.

3. Teste ELISA

Nota: Se se realizarem apenas dois testes de identificação, não deve utilizar-se outro teste serológico como complemento deste teste.

- 3.1. Preparar uma suspensão com cerca de 10^8 células por ml em 1X PBS (apêndice 4).
- 3.2. Utilizar um teste ELISA adequado com um anticorpo monoclonal específico para *R. solanacearum*.
- 3.3. Um resultado positivo no teste ELISA é alcançado se a leitura ELISA obtida para a cultura for, pelo menos, igual a metade da obtida para o controlo positivo.

4. Testes PCR

- 4.1. Preparar uma suspensão com cerca de 10^6 células por ml em água esterilizada UPW.
- 4.2. Aquecer 100 µl da suspensão de células em tubos fechados num bloco de aquecimento ou em banho-maria em ebulição a 100 °C durante 4 minutos. As amostras podem, então, ser armazenadas a uma temperatura compreendida entre -16 e -24 °C até serem necessárias.
- 4.3. Aplicar os procedimentos PCR adequados para amplificar os fragmentos específicos de *R. solanacearum* [por exemplo Seal *et al.* (1993), Pastrik e Maiss (2000), Pastrik *et al.* (2002), Boudazin *et al.* (1999), Opina *et al.* (1997), Weller *et al.* (1999)].
- 4.4. É alcançada uma identificação positiva para *R. solanacearum* se os fragmentos de amplificação da PCR tiverem a mesma dimensão e os mesmos polimorfismos dos fragmentos de restrição que a estirpe de controlo positivo.

5. Teste FISH

- 5.1. Preparar uma suspensão de cerca de 10^6 células por ml em UPW.
- 5.2. Aplicar o procedimento FISH (parte A, ponto 7, da secção VI) com, pelo menos, duas sondas específicas para *R. solanacearum* (apêndice 7).
- 5.3. Um resultado positivo no teste FISH é alcançado se a cultura apresentar as mesmas reacções do controlo positivo.

6. Perfis de ácidos gordos (FAP)

- 6.1. Incubar o isolado em agar de soja e tripticase (Oxoid) durante 48 horas a 28 °C.
- 6.2. Utilizar um procedimento FAP adequado (Janse, 1991; Stead, 1992).
- 6.3. Um resultado positivo no teste FAP é alcançado se o perfil do presumível isolado for idêntico ao do controlo positivo. A presença de ácidos gordos característicos 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH e 18:1 2OH e a ausência de 16:0 3OH são altamente indicativas de *Ralstonia* sp.

7. Métodos para caracterização da estirpe

A caracterização da estirpe utilizando um dos métodos seguintes é recomendada para cada novo caso de isolamento de *R. solanacearum*.

Incluir estirpes de referência conhecidas, sempre que adequado, para cada teste realizado (ver apêndice 3).

7.1. Determinação do biovar

A espécie *R. solanacearum* encontra-se dividida em Biovars com base na sua capacidade em utilizar e/ou oxidar três dissacáridos e três álcoois de hexoses (Hayward, 1964 e Hayward *et al.*, 1990). O meio de crescimento para o teste do Biovar é descrito no apêndice 2. O teste pode ser realizado com sucesso mediante a inoculação por picada dos meios de crescimento com culturas puras de isolados de *R. solanacearum* e incubação a 28 °C. Se os meios forem distribuídos em placas estéreis de cultura de 96 poços (200 µl por poço) pode observar-se uma mudança de cor, de verde azeitona para amarelo, passadas 72 horas, o que indica um resultado positivo.

	Biovar				
	1	2	3	4	5
Utilização de:					
Maltose	–	+	+	–	+
Lactose	–	+	+	–	+
D (+) Celobiose	–	+	+	–	+
Manitol	–	–	+	+	+
Sorbitol	–	–	+	+	–
Dulcitol	–	–	+	+	–

Testes adicionais diferenciam o Biovar 2 em subfenótipos

	Biovar 2A (Repartição mundial)	Biovar 2A (Encontrada no Chile e na Colômbia)	Biovar 2T (Encontrada nas áreas tropi- cais)
Utilização de Trealose	–	+	+
Utilização de meso-Inositol	+	–	+
Utilização de D-Ribose	–	–	+
Actividade pectolítica (1)	baixa	baixa	alta

(1) Ver Lelliott e Stead (1987).

7.2. “Genomic fingerprinting”

A diferenciação molecular das estirpes do complexo *R. solanacearum* pode ser efectuada através de várias técnicas, entre as quais são de referir:

7.2.1. Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP) (Cook *et al.*, 1989).

7.2.2. PCR de sequências repetitivas utilizando iniciadores REP, BOX e ERIC (Louws *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995).

7.2.3. Análise do polimorfismo dos fragmentos amplificados (AFLP) (Van der Wolf *et al.*, 1998).

7.3. Métodos PCR

Podem utilizar-se iniciadores específicos para PCR (Patrik *et al.*, 2002; ver apêndice 6) para diferenciar estirpes pertencentes à Divisão 1 (Biovars 3, 4 e 5) e Divisão 2 (Biovars 1, 2A e 2T) de *R. solanacearum*, como definidas inicialmente pela análise RFLP (Cook *et al.*, 1989) e a sequenciação de 16S rADN (Taghavi *et al.*, 1996).

C. Teste de confirmação

O teste de patogenicidade tem de ser efectuada como confirmação final do diagnóstico de *R. solanacearum* e para avaliar a virulência dos isolados identificados como *R. solanacearum*.

- 1) Preparar um inóculo de aproximadamente 10⁶ células por ml de uma cultura com 24-48 horas do isolado a ser testado e de uma estirpe de *R. solanacearum* adequada para controlo positivo (por exemplo NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; ver apêndice 3).
- 2) Inocular 5-10 plântulas de tomateiro ou beringela susceptíveis no estágio de três folhas verdadeiras (ver parte A, ponto 9, da secção VI).

- 3) Incubar durante, no máximo, 2 semanas a uma temperatura de 25-28 °C e elevada humidade relativa, regando adequadamente para evitar o alagamento ou a seca. Com culturas puras deve observar-se a murchidão típica no período de 14 dias. Se no final deste período não se observarem quaisquer sintomas, não se pode confirmar que a cultura seja uma forma patogénica de *R. solanacearum*.
 - 4) Observar o desenvolvimento de sintomas de murchidão e/ou epinastia, clorose e nanismo.
 - 5) Efectuar um isolamento a partir das plantas sintomáticas, retirando-lhes uma secção de cerca de 2 cm de caule acima do ponto de inoculação. Fragmentá-las e suspendê-las num pequeno volume de água destilada esterilizada ou de tampão fosfato 50 mM (apêndice 4). Isolar a partir de diluições apropriadas da suspensão por espalhamento ou reticulado num meio adequado, de preferência selectivo (apêndice 2), incubar durante 48-72 horas a 28 °C e observar a formação de colónias típicas de *R. solanacearum*.
-

Apêndice 1

Laboratórios que participaram na validação e optimização de protocolos

Laboratório (1)	Localização	País
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Viena e Linz	Áustria
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Bélgica
Plantedirektoratet	Lyngby	Dinamarca
Central Science Laboratory	York	Inglaterra
Scottish Agricultural Science Agency	Edimburgo	Escócia
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	França
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	França
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Alemanha
Pflanzenschutzamt Hannover	Hanover	Alemanha
State Laboratory	Dublin	Irlanda
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali	Bolonha	Itália
Regione Veneto Unità Periferica per i Servizi Fitosanitari	Verona	Itália
Nederlandse Algemene Keuringsdienst	Emmeloord	Países Baixos
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Países Baixos
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lisboa	Portugal
Centro de Diagnóstico de Aldearrubia	Salamanca	Espanha
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias	Valência	Espanha
Swedish University of Agricultural Sciences	Uppsala	Suécia

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

Apêndice 2

Meios para isolamento e cultura de *R. solanacearum***a) Meio geral de crescimento***Agar nutritivo (NA)*

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

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

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

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

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

Agar de sacarose e peptona (SPA)

Sacarose	20,0 g
Bacto-Peptona (Difco)	5,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g
Bacto-Agar (Difco)	15,0 g
Água destilada	1,0 l

pH 7,2-7,4

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

Meio de tetrazólio de Kelman

Casaminoácidos (Difco)	1,0 g
Bacto-Peptona (Difco)	10,0 g
Dextrose	5,0 g
Bacto-Agar (Difco)	15,0 g
Água destilada	1,0 l

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

Arrefecer até 50 °C e adicionar o volume necessário de solução de cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio (Sigma), esterilizada por filtração, para obter uma concentração final de 50 mg por l.

b) Meios de crescimento selectivo validados

Meio SMSA (Englebrecht, 1994 modificado por Elphinstone et al., 1996)

Meio basal

Casaminoácidos (Difco)	1,0 g
Bacto-Peptona (Difco)	10,0 g
Glicerol	5,0 ml
Bacto-Agar (Difco), ver Nota 2.	15,0 g
Água destilada	1,0 l

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

Arrefecer até 50 °C e adicionar o volume necessário de soluções aquosas concentradas, esterilizadas por filtração, dos seguintes ingredientes para obter as concentrações finais especificadas:

Violeta cristal (Sigma)	5 mg por l
Sulfato de polimixina B (Sigma P-1004)	600 000 U (aproximadamente 100 mg) por l
Bacitracina (Sigma B-0125)	1 250 U (aproximadamente 25 mg) por l
Cloranfenicol (Sigma C-3175)	5 mg por l
Penicilina-G (Sigma P-3032)	825 U (aproximadamente 0,5 mg)
cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (Sigma)	50 mg por l

Nota:

1. A utilização de reagentes diferentes dos acima especificados pode afectar o crescimento de *R. solanacearum*.
2. Pode utilizar-se agar Oxoid #1 em vez de Bacto-agar (Difco). Neste caso, o crescimento de *R. solanacearum* será mais lento, embora o crescimento dos saprófitas competidores possa também ser reduzido. A formação de colónias típicas de *R. solanacearum* pode demorar mais 1-2 dias e a coloração vermelha pode ser mais clara e mais difusa do que em Bacto-agar.
3. O aumento da concentração de bacitracina para 2 500 U por l pode reduzir as populações de bactérias competidoras sem afectar o crescimento de *R. solanacearum*.

Armazenar os meios e as soluções concentradas de antibióticos a 4 °C, na obscuridade, e utilizar no prazo de um mês.

As placas devem estar livres de condensação superficial antes da utilização.

Evitar a secagem excessiva das placas.

Após a preparação de cada novo lote de meio deve efectuar-se um controlo de qualidade mediante o espalhamento de uma suspensão de uma cultura de referência de *R. solanacearum* (ver apêndice 3), observando a formação de colónias típicas após incubação a 28 °C durante 2-5 dias.

c) Meios de enriquecimento validados

Meio líquido SMSA (Elphinstone et al., 1996)

Preparar de forma idêntica à do meio selectivo SMSA contendo agar, mas excluindo o Bacto-agar e o cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio.

Meio líquido de Wilbrink modificado (Caruso et al., 2002)

Sacarose	10g
Proteose peptona	5 g
K ₂ HPO ₄	0,5g
MgSO ₄	0,25g
NaNO ₃	0,25g
Água destilada	1 l

Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos e arrefecer até 50 °C.

Adicionar soluções concentradas de antibióticos como para o meio líquido SMSA.

Apêndice 3

A. Material de controlo normalizado disponível no mercado

a) *Isolados bacterianos*

Recomenda-se a utilização dos seguintes isolados bacterianos como material de referência normalizado, quer como controlos positivos (quadro 1) quer durante a optimização de testes para evitar reacções cruzadas (quadro 2). Todas as estirpes são comercializadas por:

1. National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPPB), Central Science Laboratory, York, Reino Unido.
2. Culture Collection of the Plant Protection Service (PD), Wageningen, Países Baixos.
3. Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP), INRA Station Phytobactériologie, Angers, França.

Quadro 1 Tabela de referência SMT de isolados de *R. solanacearum*

Código NCPPB	SMT #	Outros códigos	País de origem	Biovar
NCPPB 4153	6	CFBP 4582, Pr 3020, EURS11	Egipto	2
NCPPB 4154	10	CFBP 4585, 550, EURS21	Turquia	2
NCPPB 3857	12	CFBP 4587, Pr 1140, EURS26	Inglaterra	2
NCPPB 1584	23	CFBP 4598, EURS49	Chipre	2
NCPPB 2505	24	CFBP 4599, EURS50	Suécia	2
NCPPB 4155	26	CFBP 4601, 502, EURS55	Bélgica	2
NCPPB 4156 (*)	71 (*)	PD 2762, CFBP 3857	Países Baixos	2
NCPPB 4157	66	LNPV 15.59	França	2
NCPPB 4158	39	CFBP 4608, Port 448, EURS80	Portugal	2
NCPPB 4160	69	IVIA-1632-2	Espanha	2
NCPPB 4161	76	B3B	Alemanha	2
NCPPB 325	41	CFBP 2047, KEL60-1, R842	EUA	1
NCPPB 3967	42	CFBP 4610, R285, GONG7	Costa Rica	1
NCPPB 4028	43	CFBP 4611, R303/571, CIP310, SEQ205	Colômbia	2
NCPPB 3985	44	CFBP 4612, R578, CIP312	Peru	2T
NCPPB 3989	45	CFBP 4613, R568, CIP226	Brasil	2T
NCPPB 3996	46	CFBP 3928, R276/355, CIP72, SEQ225	Peru	3
NCPPB 3997	47	CFBP 4614, R280/363, CIP49, HAY0131a	Austrália	3
NCPPB 4029	48	CFBP 4615, R297/349, CIP121, CM1b2861	Sri Lanca	4
NCPPB 4005	49	CFBP 4616, R470	Filipinas	4
NCPPB 4011	50	CFBP 4617, R288, HEmps2	China	5

(*) Utilizar como estirpe de referência normalizada de *R. solanacearum* Biovar 2 (raça 3).

Nota: A autenticidade das estirpes acima indicadas só pode ser garantida se estas forem obtidas a partir de uma colecção de culturas autênticas.

Quadro 2 Tabela de referência SMT de bactérias serológica ou geneticamente relacionadas para utilização na optimização de testes de detecção

Código NCPPB	SMT #	Outro código	Identificação
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 127	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)
PPB 3726	59	CFBP 3568	<i>Banana Blood Disease Bacterium</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 1 844,06	<i>Flavobacterium</i> sp. (1) (2)

(1) Estirpe que pode produzir uma reacção cruzada em testes serológicos (IF e/ou ELISA) com anti-soros policlonais.

(2) Estirpe a partir da qual, nalguns laboratórios, o produto da PCR pode ser amplificado com um tamanho idêntico ao esperado utilizando iniciadores específicos OLI-1 e Y-2 (ver apêndice 6).

(3) Susceptível de provocar reacções cruzadas na maior parte dos testes, mas apenas é conhecida a sua ocorrência em bananeira na Indonésia.

b) *Material de controlo normalizado disponível no mercado*

O material de controlo seguidamente indicado está disponível na colecção de culturas NCPPB.

Sedimento liofilizado de extracto de batata proveniente de 200 tubérculos de batatas sãs como controlo negativo para todos os testes.

Sedimento liofilizado de extracto de batata proveniente de 200 tubérculos de batatas sãs com 10^3 a 10^4 e 10^4 a 10^6 células de *R. solanacearum* Biovar 2 (estirpe NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) como controlo positivo para testes serológicos e PCR. Visto que a viabilidade das células é afectada durante a liofilização, estes controlos não são adequados como controlos normalizados para testes de isolamento ou bioensaio.

Suspensões fixadas em formalina de *R. solanacearum* Biovar 2 (estirpe NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) com 10^6 células por ml como controlos positivos para testes serológicos.

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

Preparar uma suspensão a partir do crescimento de uma cultura com 48 horas em meio basal SMSA de uma estirpe virulenta de *R. solanacearum* Biovar 2/raça 3 (por exemplo estirpe NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3 857) em tampão fosfato 10 mM, de modo a obter uma concentração de, aproximadamente, 2×10^8 ufc por ml. Esta é obtida, normalmente, com uma suspensão ligeiramente turva equivalente a uma densidade óptica de 0,15 a 600 nm.

Remover os cones dos hilos de 200 tubérculos colhidos de uma variedade de epiderme branca, isenta de *R. solanacearum*.

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

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

Transferir 100 µl da suspensão de *R. solanacearum* para o primeiro microtubo. Agitar em vórtice.

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

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

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

A presença e a quantificação de *R. solanacearum* nas amostras de controlo deverão ser primeiro confirmadas por IF.

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

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

Para os testes IF, FISH e PCR, deverá detectar-se *R. solanacearum*, pelo menos, nas amostras de controlo positivo com 10^6 e 10^4 células por ml e não deverá ser detectada em nenhum controlo negativo.

Apêndice 4

Tampões para a realização dos testes

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

1. Tampões para extracção**1.1. Tampão de extracção (tampão fosfato 50 mM, pH 7,0)**

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

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

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

Os seguintes componentes adicionais podem também ser úteis:

	<i>Finalidade</i>	<i>Quantidade (por l)</i>
Flocos de Lubrol	Antifloculante (*)	0,5 g
Antiespuma DC silicone	Antiespumante (*)	1,0 ml
Pirofosfato tetrassódico	Antioxidante	1,0 g
Polivinilpirrolidona-40 000 (PVP-40)	Complexante de inibidores da PCR	50 g

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

1.2. Tampão de ressuspensão (tampão fosfato 10 mM, pH 7,2)

Este tampão é utilizado para a ressuspensão e diluição dos extractos dos hilos do tubérculo da batateira após a sua concentração por centrifugação.

Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	0,4 g
Água destilada	1,0 l

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

2. Tampões para o teste IF**2.1. Tampão IF (tampão fosfato salino (PBS) 10 mM, pH 7,2)**

Este tampão é utilizado para a diluição dos anticorpos.

Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	0,4 g
NaCl	8,0 g
Água destilada	1,0 l

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

2.2. Tampão IF-Tween

Este tampão é utilizado para lavagem das lâminas.

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

2.3. Tampão fosfato com glicerol, pH 7,6

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

Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	3,2 g
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	0,15 g
Glicerol	50 ml
Água destilada	100 ml

Estão disponíveis no mercado soluções de montagem para evitar a rápida perda de fluorescência, como sejam, por exemplo, Vectashield® (Vector Laboratories) ou Citifluor® (Leica).

3. Tampões para o teste ELISA indirecto

3.1. Tampão de revestimento de dupla concentração, pH 9,6

Na ₂ CO ₃	6,36 g
NaHCO ₃	11,72 g
Água destilada	1,00 l

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

Pode ser acrescentado sulfito de sódio (0,2 %) como antioxidante, se for necessário para evitar a acumulação de compostos aromáticos oxidados.

3.2. Tampão fosfato salino (PBS) 10x, pH 7,4

NaCl	80,0 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	29,0 g
KCl	2,0 g
Água destilada	1,0 l

3.3. PBS-Tween

PBS 10x	100 ml
Tween 20 a 10 %	5 ml
Água destilada	895 ml

3.4. Tampão de bloqueio (anticorpo) - deve ser preparado na altura da utilização

PBS 10x	10,0 ml
Polivinilpirrolidona-44000 (PVP-44)	2,0 g
Tween 20 a 10 %	0,5 ml
Leite em pó	0,5 g
Água destilada	perfazer 100 ml

3.5. Solução de substrato de fosfatase alcalina, pH 9,8

Dietanolamina	97 ml
Água destilada	800 ml

Misturar e acertar a pH 9,8 com HCl concentrado.

Perfazer o volume até 1 l com água destilada.

Juntar 0,2 g de MgCl₂.

Dissolver duas pastilhas de 5 mg cada de substrato de fosfatase alcalina (Sigma) por cada 15 ml de solução.

4. Tampões para o teste DASI ELISA

4.1. Tampão de revestimento, pH 9,6

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g
Água destilada	1 000 ml

Dissolver os ingredientes e verificar o pH 9,6.

4.2. Tampão fosfato salino (PBS) 10x, 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
Água destilada	1 000 ml

4.3. PBS-Tween

PBS 10x	50 ml
Tween 20 a 10 %	5 ml
Água destilada	950 ml

4.4. Tampão de substrato, pH 9,8

Dietanolamina	100 ml
Água destilada	900 ml

Misturar e acertar a pH 9,8 com HCl concentrado.

Apêndice 5

Determinação do nível de contaminação em testes IF e FISH

1. Determinar o número médio de células fluorescentes típicas por campo de observação (c).
2. Calcular o número de células fluorescentes típicas por poço de lâmina de microscópio (C).

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

em que S = área da superfície de cada poço da lâmina de multipoços

e s = área da superfície do campo da objectiva

$$s = \pi^2/4G^2K^2 \quad \text{em que} \quad i = \text{coeficiente de campo (varia entre 8 e 24, dependendo do tipo de ocular)}$$

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

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

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

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

em que y = volume de sedimento ressuspenso em cada poço

e F = factor de diluição do sedimento ressuspenso.

Apêndice 6

Protocolos e reagentes validados para PCR

Nota: Os testes preliminares deveriam permitir a detecção reprodutível de 10^3 a 10^4 células de *R. solanacearum* por ml de extracto de amostra.

Os testes preliminares não deveriam ainda revelar nenhum resultado falso positivo com um painel de estirpes bacterianas seleccionadas (ver apêndice 3).

1. Protocolo PCR de Seal et al. (1993)

1.1. Iniciadores

Iniciador directo OLI-1 5'-GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC-3'

Iniciador inverso Y-2 5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'

Tamanho esperado do fragmento amplificado do ADN-alvo de *R. solanacearum* = 288 bp

1.2. Mistura de reacção da PCR

Reagentes	Volume por reacção	Concentração final
UPW esterilizada	17,65 µl	
Tampão PCR (1) 10x (MgCl ₂ 15 mM)	2,5 µl	1x (MgCl ₂ 1,5 mM)
Mistura dNTP (20 mM)	0,25 µl	0,2 mM
Iniciador OLI-1 (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Iniciador Y-2 (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Taq Polimerase (5U/µl) (1)	0,1 µl	0,5 U
Volume da amostra	2,0 µl	
Volume total:	25 µl	

(1) O método foi validado utilizando Taq polimerase da Perkin Elmer (AmpliTaq) e Gibco BRL.

1.3. Condições de reacção da PCR

Correr o seguinte programa:

- 1 ciclo de: i) 2 minutos a 96 °C (desnaturação do ADN-alvo)
- 35 ciclos de: ii) 20 segundos a 94 °C (desnaturação do ADN-alvo)
- iii) 20 segundos a 68 °C (emparelhamento dos iniciadores)
- iv) 30 segundos a 72 °C (extensão da cópia)
- 1 ciclo de: v) 10 minutos a 72 °C (extensão final)
- vi) manter a uma temperatura de 4 °C

Nota: Este programa foi optimizado para utilização com um termociclador Perkin Elmer 9600. Para a utilização com outros modelos pode ser necessária a alteração da duração das fases dos ciclos ii), iii) e iv).

1.4. Análise de restrição enzimática do fragmento amplificado

Os produtos da PCR amplificados a partir de ADN de *R. solanacearum* produzem um polimorfismo dos fragmentos de restrição característico com a enzima *Ava* II após incubação a 37 °C.

2. Protocolo PCR de Pastrik e Maiss (2000)

2.1. Iniciadores

Iniciador directo Ps-1 5'-agt cga acg gca gcg ggg g-3'

Iniciador inverso Ps-2 5'-ggg gat ttc aca tcg gtc ttg ca-3'

Tamanho esperado do fragmento amplificado de ADN-alvo de *R. solanacearum* = 553 bp.

2.2. Mistura de reacção da PCR

Reagentes	Volume por reacção	Concentração final
UPW esterilizada	16,025 µl	
Tampão PCR (1) 10x	2,5 µl	1x (MgCl ₂ 1,5 mM)
BSA (fracção V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
Mistura d-NTP (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Iniciador Ps-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Iniciador Ps-2 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Taq Polimerase (5U/µl) (1)	0,1 µl	0,5 U
Volume da amostra	5,0 µl	
Volume total:	25,0 µl	

(1) O método foi validado utilizando Taq polimerase da Perkin Elmer (AmpliTaq) e Gibco BRL.

Nota: Originalmente optimizado para termociclador MJ Research PTC 200 com Taq Polymerase da Gibco.

Pode também utilizar-se AmpliTaq e tampão Perkin Elmer, com as mesmas concentrações.

2.3. Condições de reacção da PCR

Correr o seguinte programa:

- 1 ciclo de: i) 5 minutos a 95 °C (desnaturação do ADN-alvo)
- 35 ciclos de: ii) 30 segundos a 95 °C (desnaturação do ADN-alvo)
- iii) 30 a 68 °C (emparelhamento dos iniciadores)
- iv) 45 segundos a 72 °C (extensão da cópia)
- 1 ciclo de: v) 5 minutos a 72 °C (extensão final)
- vi) manter a uma temperatura de 4 °C.

Nota: Este programa foi optimizado para utilização com um termociclador MJ Research PTC 200. Para a utilização com outros modelos pode ser necessária a alteração da duração das fases dos ciclos ii), iii) e iv).

2.4. Análise de restrição enzimática do fragmento amplificado.

Os produtos da PCR amplificados a partir de ADN de *R. solanacearum* produzem um polimorfismo do fragmento de restrição característico com a enzima Taq I após incubação a 65 °C durante 30 minutos. Os fragmentos de restrição obtidos de um fragmento específico de *R. solanacearum* têm tamanhos de 457 bp e 96 bp.

3. Protocolo PCR Multiplex com controlo interno (Pastrik et al., 2002)

3.1. Iniciadores

Iniciador directo RS-1-F 5'-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3'

Iniciador inverso RS-1-R 5'-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3'

Iniciador directo NS-5-F 5'-AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G-3'

Iniciador inverso NS-6-R 5'-GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC-3'

Tamanho esperado do fragmento amplificado de ADN-alvo de *R. solanacearum* = 718 bp (conjunto iniciador RS)

Tamanho esperado do fragmento amplificado do controlo interno da PCR de 18S rARN = 310 bp (conjunto iniciador NS).

3.2. Mistura de reacção da PCR

Reagentes	Volume por reacção	Concentração final
UPW esterilizada	12,625 µl	
Tampão PCR ⁽¹⁾ 10x (MgCl ₂ 15 mM)	2,5 µl	1x (MgCl ₂ 1,5 mM)
BSA (fracção V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
Mistura d-NTP (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Iniciador RS-1-F (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Iniciador RS-1-R (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Iniciador NS-5-F (10 µM) ⁽²⁾	0,15 µl	0,06 µM
Iniciador NS-6-R (10 µM) ⁽²⁾	0,15 µl	0,06 µM
<i>Taq</i> polimerase (5U/µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1,0 U
Volume da amostra	5,0 µl	
Volume total:	25,0 µl	

⁽¹⁾ O método foi validado utilizando *Taq* polimerase da Perkin Elmer (Ampli^{Taq}) e Gibco BRL.

⁽²⁾ A concentração de iniciadores NS-5-F e NS-6-R foi otimizada para a extracção da bactéria a partir dos cones dos hilos da bata-teira, utilizando o método de homogeneização bem como o de purificação do ADN de acordo com Pastrik (2000) (ver parte A, ponto 6.1, alínea a), da secção VI). Será necessária a re-otimização das concentrações do reagente se se utilizar a extracção por agitação ou outros métodos de isolamento do ADN.

3.3. Condições de reacção da PCR

Correr o seguinte programa:

- 1 ciclo de: i) 5 minutos a 95 °C (desnaturação do ADN-alvo)
- 35 ciclos de: ii) 30 segundos a 95 °C (desnaturação do ADN-alvo)
- iii) 30 segundos a 58 °C (emparelhamento dos iniciadores)
- iv) 45 segundos a 72 °C (extensão da cópia)
- 1 ciclo de: v) 5 minutos a 72 °C (extensão final)
- vi) manter a uma temperatura de 4 °C

Nota: Este programa foi optimizado para utilização com um termociclador MJ Research PTC 200. Para a utilização com outros modelos pode ser necessária a alteração da duração das fases dos ciclos ii), iii) e iv).

3.4. Análise de restrição enzimática do fragmento amplificado

Os produtos da PCR amplificados a partir de ADN de *R. solanacearum* produzem um polimorfismo do fragmento de restrição característico com a enzima *Bsm* I ou um isosquizómero (e.g. *Mva* 1269 I) após incubação a 65 °C durante 30 minutos.

4. Protocolo PCR específico para os Biovars de *R. solanacearum* (Pastrik et al, 2001)

4.1. Iniciadores

Iniciador directo Rs-1-F 5'-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3'

Iniciador inverso Rs-1-R 5'-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3'

Iniciador inverso Rs-3-R 5'-TTC ACG GCA AGA TCG CTC-3'

Tamanho esperado do fragmento amplificado de ADN-alvo de *R. solanacearum*:

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

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

4.2. Mistura de reacção da PCR

a) PCR específica para os Biovares 1 e 2

Reagentes	Volume por reacção	Concentração final
UPW esterilizada	12,925 µl	
tampão PCR ⁽¹⁾ 10x	2,5 µl	1x (MgCl ₂ 1,5 mM)
BSA (fracção V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
Mistura d-NTP (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Iniciador Rs-1-F (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Iniciador Rs-1-R (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Taq polimerase (5U/µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1 U
Volume da amostra	5,0 µl	
Volume total:	25,0 µl	

⁽¹⁾ O método foi validado utilizando Taq polimerase da Perkin Elmer (AmpliTaq) e Gibco BRL.

b) PCR específica para os Biovares 3, 4 e 5

Reagentes	Volume por reacção	Concentração final
UPW esterilizada	14,925 µl	
Tampão PCR ⁽¹⁾ 10x	2,5 µl	1x (MgCl ₂ 1,5 mM)
BSA (fracção V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
Mistura d-NTP (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Iniciador Rs-1-F (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Iniciador Rs-3-R (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Taq polimerase (5U/µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1 U
Volume da amostra	5,0 µl	
Volume total:	25,0 µl	

⁽¹⁾ O método foi validado utilizando Taq polimerase da Perkin Elmer (AmpliTaq) e Gibco BRL.

4.3. Condições de reacção da PCR

Correr o seguinte programa para as reacções específicas dos Biovares 1/2 e 3/4/5:

- 1 ciclo de: i) 5 minutos a 95 °C (desnaturação do ADN-alvo)
- 35 ciclos de: ii) 30 segundos a 95 °C (desnaturação do ADN-alvo)
- iii) 30 segundos a 58 °C (emparelhamento dos iniciadores)
- iv) 45 segundos a 72 °C (extensão da cópia)
- 1 ciclo de: v) 5 minutos a 72 °C (extensão final)
- vi) manter a uma temperatura de 4 °C

Nota: Este programa foi optimizado para utilização com um termociclador MJ Research PTC 200. Para a utilização com outros modelos pode ser necessária a alteração da duração das fases dos ciclos ii), iii) e iv).

4.4. Análise de restrição enzimática do fragmento amplificado

Os produtos da PCR amplificados a partir de ADN de *R. solanacearum* utilizando os iniciadores Rs-1-F e Rs-1-R produzem um polimorfismo do fragmento de restrição característico com a enzima *Bsm* I ou um isosquízómero (por exemplo *Mva* 1269 I) após incubação a 65 °C durante 30 minutos. Os produtos da PCR amplificados a partir de ADN de *R. solanacearum* utilizando os iniciadores Rs-1-F e Rs-3-R não apresentam locais de restrição.

5. Preparação do tampão de carregamento5.1. Azul de bromofenol (**solução concentrada** a 10 %)

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

5.2. Tampão de carregamento

Glicerol (86 %)	3,5 ml
Azul de bromofenol (5.1)	300 µl
Água destilada (bidest)	6,2 ml

6. Tampão de tris acetato EDTA (TAE) 10X, pH 8,0

Tampão tris	48,40 g
Ácido acético glacial	11,42 ml
EDTA (sal dissódico)	3,72 g
Água destilada	1,00 l

Diluir até 1x antes de utilizar.

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

Apêndice 7

Reagentes validados para o teste FISH

1. Sondas

Sonda específica para *R. solanacearum* OLI-1-CY3: 5'-ggc agg tag caa gct acc ccc-3'

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

2. Solução fixadora

[ATENÇÃO! O FIXADOR CONTÉM PARAFORMALDEÍDO, UM PRODUTO TÓXICO. UTILIZAR LUVAS E NÃO INALAR. É ACONSELHÁVEL TRABALHAR EM "HOTTE"]

- i) Aquecer 9 ml de água de grau molecular [por exemplo água ultra pura (UPW)] a cerca de 60 °C e adicionar 0,4 g de paraformaldeído. O paraformaldeído dissolve-se após a adição de 5 gotas de NaOH 1N e a agitação com um agitador magnético.
- ii) Ajustar o pH a 7,0 mediante adição de 1 ml de tampão fosfato 0,1 M (PB, pH 7,0) e 5 gotas de HCl 1N. Verificar o pH com papel indicador e ajustar, se necessário, com HCl ou NaOH. [ATENÇÃO! NÃO UTILIZAR UM MEDIDOR DE PH EM SOLUÇÕES CONTENDO PARAFORMALDEÍDO]
- iii) Filtrar a solução através de um filtro de membrana de 0,22 µm e manter ao abrigo da poeira a 4 °C até à sua utilização.

3. "Hybmix" 3x

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

Diluir até 1x, conforme necessário.

4. Solução de hibridação

"Hybmix" 1x

Dodecilsulfato de sódio (SDS)	0,01 %
Formamida	30 %
Sonda EUB 338	5 ng/µl
Sonda OLI-1 ou OLI-2	5 ng/µl

Preparar quantidades de solução de hibridação de acordo com os cálculos do quadro 1. Para cada lâmina (contendo 2 amostras diferentes em duplicado) são necessários 90 µl de solução de hibridação. **IMPORTANTE: A FORMAMIDA É MUITO TÓXICA. USAR LUVAS E TOMAR AS MEDIDAS DE SEGURANÇA NECESSÁRIAS!**

Quadro 1 Quantidades sugeridas para a preparação da solução de hibridação.

Número de lâminas:	1	4	6	8	10
UPW esterilizada	23,1	92,4	138,6	184,8	231,0
Hybmix 3x	30,0	120,0	180,0	240,0	300,0
SDS 1 %	0,9	3,6	5,4	7,2	9,0
Formamida	27,0	108,0	162,0	216,0	270,0
Sonda EUB 338 (100 ng/µl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Sonda OLI-1 ou OLI-2 (100 ng/µl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Volume total (µl)	90,0	360,0	540,0	720,0	900,0

NB.: Armazenar todas as soluções contendo sondas fotossensíveis na obscuridade a uma temperatura de - 20 °C. Proteger da exposição directa à luz solar ou eléctrica durante a utilização.

5. Tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0

Na ₂ HPO ₄	8,52 g
KH ₂ PO ₄	5,44 g
Água destilada	1,00 l

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

Apêndice 8

Condições de Cultivo de beringela e tomateiro

Semear tomateiros (*Lycopersicon esculentum*) ou beringelas (*Solanum melongena*) em tabuleiros com substrato pasteurizado. O transplante das plântulas faz-se quando os cotilédones estão completamente expandidos (10 a 14 dias), para substrato de cultura pasteurizado.

As beringelas ou os tomateiros devem ser cultivados em estufa nas seguintes condições ambientais antes da inoculação:

Fotoperíodo	14 horas ou duração do dia natural se esta for superior;
Temperatura	diurna: 21 a 24 °C nocturna: 14 a 18 °C
Variedade de tomateiro susceptível	“Moneymaker”
Variedade de beringela susceptível	“Black Beauty”
Fornecedores:	ver sítio <i>web</i> http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

REFERÊNCIAS

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). *Klewer Academic Publishers*. pp. 117-121.
17. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J., 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2286-2295.
18. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85; 528-536.
19. Opina, N., F. Tavner, G. Holloway, J.-F. Wang, T.-H. Li, R. Maghirang, M. Fegan, A.C. Hayward, V. Krishnapillai, W.F. Hong, B.W. Holloway, J.N. Timmis. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *As Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 5; 19-33.
20. 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.
-

ANEXO III

1. Sempre que, em caso de ocorrência suspeita, para os materiais vegetais da lista e para todos os outros casos, surja um resultado positivo no(s) teste(s) de rastreio efectuado(s) em conformidade com os métodos pertinentes constantes do anexo II, e se aguarde a confirmação ou refutação através da conclusão dos referidos métodos, deve-se proceder à retenção e conservação adequada de:
 - todos os tubérculos e, sempre que possível, todas as plantas sujeitos a amostragem,
 - qualquer extracto restante e outro material preparado para o(s) teste(s) de rastreio como, por exemplo, lâminas de imunofluorescência,
 - e
 - toda a documentação relevante,até à conclusão dos referidos métodos.

A retenção dos tubérculos permitirá a realização, sempre que necessário, do teste de variedade.
 2. Em caso de confirmação da presença do organismo, deve proceder-se à retenção e à conservação adequada durante pelo menos um mês após a notificação nos termos do n.º 2 do artigo 5.º:
 - do material referido no n.º 1,
 - de uma amostra do material contaminado de tomateiro ou de beringela inoculada com o extracto do tubérculo ou da planta, se for caso disso,
 - e
 - de uma cultura isolada do organismo.
-

ANEXO IV

Os elementos da investigação referida no n.º 1, alínea a), subalínea i), do artigo 5.º, deverão incluir, sempre que relevante:

- i) Locais de produção:
- em que se cultive ou se tenha cultivado batata que tenha uma relação clonal com batata que se verificou estar infectada pelo organismo,
 - em que se cultive ou se tenha cultivado tomate da mesma origem que o tomate que se verificou estar infectado pelo organismo,
 - em que se cultive ou se tenha cultivado batata ou tomate que tenham sido colocados sob controlo oficial por se suspeitar da ocorrência do organismo,
 - em que se cultive ou se tenha cultivado batata que tenha uma relação clonal com batata cultivada em locais de produção que se verificou estarem contaminados pelo organismo,
 - em que se cultive batata ou tomate e que estejam localizados na vizinhança de locais de produção contaminados pelo organismo, incluindo os locais de produção que partilhem entre si equipamentos e instalações de produção, directamente ou através de um contratante comum,
 - em que se utilizem, para irrigação ou aspersão, águas superficiais provenientes de qualquer ponto de água de que se suspeite ou esteja confirmada a contaminação pelo organismo,
 - em que se utilizem, para irrigação ou aspersão, águas superficiais provenientes de um ponto de água partilhado com locais de produção de que se suspeite ou esteja confirmada a contaminação pelo organismo,
 - que estejam, ou tenham sido, inundados por águas superficiais de que se suspeite ou esteja confirmada a contaminação pelo organismo,
- e
- ii) Águas superficiais utilizadas para irrigação ou aspersão do(s) campo(s) ou local(is) de produção de que esteja confirmada a contaminação pelo organismo, ou que tenham inundado os mesmos.
-

ANEXO V

1. Os elementos a considerar para determinar a extensão da contaminação provável nos termos do n.º 1, alínea a), subalínea iii), e alínea c), subalínea iii), do artigo 5.º deverão incluir:
 - os materiais vegetais da lista cultivados num local de produção que tenha sido declarado contaminado ao abrigo do n.º 1, alínea a), subalínea ii), do artigo 5.º,
 - local(is) de produção com alguma relação de produção com os materiais vegetais da lista declarados contaminados ao abrigo do n.º 1, alínea a), subalínea ii), do artigo 5.º, incluindo os que partilham equipamentos e instalações de produção, directamente ou através de um contratante comum,
 - os materiais vegetais da lista produzidos no(s) local(is) de produção referido(s) no travessão anterior, ou que tenham estado presentes nesse(s) local(is) durante o período em que os materiais vegetais da lista declarados contaminados ao abrigo do n.º 1, alínea a), subalínea ii), do artigo 5.º se encontravam no local de produção referido no primeiro travessão,
 - instalações nas quais se manuseiem os materiais vegetais da lista provenientes dos locais de produção referidos nos travessões anteriores,
 - quaisquer máquinas, veículos, recipientes, armazéns ou respectivas partes e quaisquer outros objectos, incluindo material de embalagem, que possam ter estado em contacto com os materiais vegetais da lista declarados contaminados ao abrigo do n.º 1, alínea a), subalínea ii), do artigo 5.º,
 - quaisquer materiais vegetais da lista que tenham estado armazenados em, ou em contacto com, qualquer das estruturas ou objectos referidos no travessão anterior, antes da limpeza e desinfecção dessas estruturas e objectos,
 - em resultado das investigações e testes referidos no n.º 1, alínea a), subalínea i), do artigo 5.º, no caso da batata, os tubérculos ou plantas que tenham uma relação clonal colateral ou parental e, no caso do tomate, as plantas que tenham a mesma origem que os materiais vegetais da lista declarados contaminados ao abrigo do n.º 1, alínea a), subalínea ii), do artigo 5.º e em relação aos quais, embora os testes se tenham revelado negativos no que diz respeito ao organismo, a contaminação se afigure provável através de uma ligação clonal. O teste de variedade pode ser efectuado no sentido de verificar a identidade dos tubérculos ou plantas contaminados que tenham uma relação clonal,
 - local(is) de produção dos materiais vegetais da lista referidos no travessão anterior,
 - local(is) de produção dos materiais vegetais da lista que tenham usado, para irrigação ou aspersão, águas declaradas contaminadas ao abrigo do n.º 1, alínea c), subalínea ii), do artigo 5.º,
 - materiais vegetais da lista produzidos em campos inundados por águas superficiais de que esteja confirmada a contaminação.
2. Os elementos a considerar para determinar a possível dispersão, ao abrigo do n.º 1, alínea a), subalínea iv), e alínea c), subalínea iii), do artigo 5.º, deverão incluir:
 - i) nos casos abrangidos pelo n.º 1, alínea a), subalínea iv), do artigo 5.º,
 - a proximidade de outros locais de produção que cultivem materiais vegetais da lista,
 - a produção ou utilização comuns de lotes de batata de semente,
 - os locais de produção que utilizem águas superficiais para irrigação ou aspersão dos materiais vegetais da lista, nos casos em que haja ou tenha havido risco de escorrência ou de inundação por essas águas a partir de locais de produção declarados contaminados ao abrigo do n.º 1, alínea a), subalínea ii), do artigo 5.º;

- ii) nos casos em que as águas superficiais tenham sido declaradas contaminadas ao abrigo do n.º 1, alínea c), subalínea ii), do artigo 5.º:
- o(s) local(is) de produção em que sejam produzidos materiais vegetais da lista adjacente(s) a, ou que esteja(m) em perigo de ser inundado(s) por, águas superficiais declaradas contaminadas,
 - qualquer bacia de irrigação distinta que esteja associada às águas superficiais declaradas contaminadas,
 - massas de água ligadas às águas superficiais declaradas contaminadas, tendo em conta:
 - a direcção e o caudal das águas declaradas contaminadas,
 - a presença de plantas solanáceas silvestres hospedeiras.
3. A notificação a que se refere o n.º 2, primeiro parágrafo, do artigo 5.º conterá os seguintes dados:
- imediatamente após a presença do organismo ter sido confirmada por testes laboratoriais, com recurso aos métodos estabelecidos no anexo II, pelo menos:
 - no caso da batata,
 - a) o nome da variedade do lote,
 - b) o tipo (de consumo, de semente, etc.) e, sempre que aplicável, a categoria das sementes,
 - no caso das plantas de tomateiro, o nome da variedade do lote e, sempre que aplicável, a categoria,
 - sem prejuízo da exigência de notificação dos casos de ocorrência suspeita prevista no n.º 3 do artigo 4.º, o Estado-Membro em que a ocorrência tenha sido confirmada deve, sempre que exista um risco de contaminação dos materiais vegetais da lista provenientes ou com destino a outro(s) Estado(s)-Membro(s), transmitir imediatamente ao(s) Estado(s)-Membro(s) em questão as informações que lhe(s) permitam cumprir o disposto no n.º 3 do artigo 5.º, tais como:
 - a) o nome da variedade do lote de batata ou tomate,
 - b) o nome e o endereço do expedidor e do destinatário,
 - c) a data da entrega do lote de batata ou tomate,
 - d) a dimensão do lote de batata ou tomate entregue,
 - e) uma cópia do passaporte fitossanitário ou, pelo menos, o número do passaporte fitossanitário, sempre que adequado, ou, se for o caso, o número de registo do produtor ou comerciante e uma cópia da nota de entrega.
- A Comissão deve ser notificada imediatamente sempre que tal informação seja fornecida.
4. A notificação adicional a que se refere o n.º 2, segundo parágrafo, do artigo 5.º conterá os seguintes dados:
- Para cada caso e após a conclusão de todas as investigações:
- a) a data de confirmação da contaminação,
 - b) uma descrição sucinta da investigação efectuada para identificar a fonte e a possível propagação da contaminação, incluindo o nível da amostragem efectuada,
 - c) informação sobre a(s) fonte(s) de contaminação identificada(s) ou presumida(s),
 - d) pormenores sobre a extensão da contaminação declarada, incluindo o número de locais de produção e, no caso da batata, o número de lotes, com a indicação da variedade e, caso se trate de batata para semente, da categoria,

- e) pormenores relativos à demarcação da zona, incluindo o número de locais de produção não declarados como contaminados mas incluídos na zona,
 - f) pormenores relativos às águas declaradas, incluindo o nome e a localização da massa de água e a extensão das águas declaradas/proibidas para irrigação,
 - g) para qualquer remessa ou lote de plantas de tomateiro declarado contaminado, os certificados previstos no n.º 1, alínea ii), do artigo 13.º da Directiva 2000/29/CE e o número de passaporte, em conformidade com a lista incluída na parte A, secção 1, ponto 2.2, do anexo V da Directiva 2000/29/CE,
 - h) quaisquer outras informações relacionadas com o(s) surto(s) confirmado(s) que a Comissão venha a solicitar.
-

ANEXO VI

1. As disposições a que se refere o n.º 1 do artigo 6.º consistirão:
- na utilização para a alimentação animal após tratamento térmico que garanta a impossibilidade de sobrevivência do organismo,
 - ou
 - na eliminação num local de eliminação de resíduos destinado especificamente a esse efeito e aprovado oficialmente em que não existam riscos identificáveis de fuga do organismo para o meio ambiente, por exemplo através da escorrência para terras agrícolas ou do contacto com pontos de água que possam ser utilizados para a irrigação de terras agrícolas,
 - ou
 - na incineração,
 - ou
 - na transformação industrial através de entrega directa e imediata a uma unidade de transformação com instalações de eliminação de resíduos oficialmente aprovadas, relativamente às quais se tenha concluído pela não existência de qualquer risco identificável de dispersão do organismo, e dotadas de um sistema de limpeza e desinfectação, pelo menos, dos veículos de transporte que saem da referida unidade,
 - ou
 - noutras medidas, desde que se tenha concluído que não existe qualquer risco identificável de dispersão do organismo; essas medidas, bem como a respectiva justificação, devem ser notificadas à Comissão e aos restantes Estados-Membros.

Quaisquer resíduos remanescentes associados às opções acima indicadas e que resultem das mesmas serão eliminados por métodos oficialmente aprovados em conformidade com o anexo VII da presente directiva.

2. A utilização ou eliminação adequada dos materiais vegetais da lista a que se refere o n.º 2 do artigo 6.º, sob controlo dos organismos oficiais responsáveis do(s) Estado(s)-Membro(s) em causa, com a devida comunicação entre organismos oficiais responsáveis para garantir esse controlo a todo o momento e a aprovação pelo organismo oficial responsável do Estado-Membro em que a batata irá ser embalada ou transformada no que diz respeito às instalações de eliminação de resíduos a que se referem os primeiro e segundo travessões, será:
- i) Para os tubérculos de batata:
- utilização como batata de consumo, embalada para entrega e utilização directa sem mudança de embalagem, num local com instalações de eliminação de resíduos adequadas. As batatas destinadas à plantação apenas podem ser manuseadas no mesmo local se tal for feito separadamente ou após limpeza e desinfectação,
 - ou
 - utilização como batata de consumo para transformação industrial e destinada a entrega directa e imediata a uma unidade de transformação com instalações adequadas de eliminação de resíduos e um sistema de limpeza e desinfectação, pelo menos, dos veículos de transporte que saem da referida unidade,
 - ou
 - qualquer outra utilização ou forma de eliminação, desde que seja comprovado que não existe qualquer risco reconhecido de dispersão do organismo e sob reserva de aprovação pelos referidos organismos oficiais responsáveis;
- ii) Para outras partes das plantas, incluindo resíduos de caules e folhas,
- destruição,
 - ou
 - qualquer outra utilização ou forma de eliminação, desde que seja comprovado que não existe qualquer risco reconhecido de dispersão do organismo, e sob reserva de aprovação pelos referidos organismos oficiais responsáveis.

3. Os métodos adequados para a descontaminação dos objectos referidos no n.º 3 do artigo 6.º serão a limpeza e, quando necessário, desinfecção, de forma a garantir que não existe qualquer risco reconhecido de dispersão do organismo. A sua aplicação terá lugar sob supervisão dos organismos oficiais responsáveis dos Estados-Membros.
4. A série de medidas a aplicar pelos Estados-Membros na(s) zona(s) demarcada(s) ao abrigo do n.º 1, alínea a), subalínea iv), e alínea c), subalínea iii), do artigo 5.º, a que se refere o n.º 4 do artigo 6.º deverá incluir:
 - 4.1. Nos casos em que os locais de produção tenham sido declarados contaminados ao abrigo do n.º 1, alínea a), subalínea ii), do artigo 5.º:
 - a) Nos campos ou unidades de produção de culturas protegidas declarados contaminados ao abrigo do n.º 1, alínea a), subalínea ii), do artigo 5.º, será aplicada uma das seguintes opções:
 - i) Durante pelo menos os quatro períodos de cultura subsequentes à declaração de contaminação:
 - serão tomadas medidas para eliminar as plantas espontâneas de batateira ou de tomateiro, bem como outras plantas hospedeiras do organismo, incluindo solanáceas infestantes,
 - e
 - não poderão ser plantados:
 - tubérculos, plantas nem sementes verdadeiras de batateira,
 - sementes nem plantas de tomateiro,
 - tendo em conta a biologia do organismo:
 - outras plantas hospedeiras,
 - plantas de espécies do género *Brassica* para as quais exista um risco reconhecido de sobrevivência do organismo,
 - culturas para as quais exista um risco reconhecido de dispersão do organismo;
 - na primeira época de colheita de batata ou tomate subsequente ao período especificado no travessão anterior, e sob condição de o campo ter sido considerado livre de plantas espontâneas de batateira ou de tomateiro e de outras plantas hospedeiras, incluindo solanáceas infestantes, durante inspecções oficiais em, pelo menos, dois períodos de cultura consecutivos anteriores à plantação:
 - no caso da batata, apenas será permitida a produção de batata para consumo,
 - no caso da batata e do tomate, os tubérculos de batata colhidos ou as plantas de tomateiro, conforme adequado, deverão ser testados em conformidade com o procedimento referido no anexo II;
 - na época de colheita de batata ou de tomate seguinte à referida no travessão anterior e após um ciclo de rotação adequado, que será de dois anos, no mínimo, se se pretender cultivar batata de semente, será efectuada uma prospecção oficial nos termos do n.º 1 do artigo 2.º;
 - ou
 - ii) Durante os cinco anos de cultura subsequentes ao da declaração de contaminação,
 - serão tomadas medidas para eliminar as plantas espontâneas de batateira ou de tomateiro, bem como outras plantas hospedeiras naturais do organismo, incluindo solanáceas infestantes,
 - e
 - o campo será tratado e mantido, durante os primeiros três anos, em pousio completo ou plantado com cereais de acordo com o risco reconhecido, ou como pastagem permanente, com frequentes cortes ou com pastorícia intensiva, ou plantado com gramíneas destinadas à produção de semente, a que se seguirão dois anos em que serão plantadas plantas que não sejam hospedeiras do organismo e para as quais não exista um risco reconhecido de sobrevivência ou dispersão do organismo,

- na primeira época de colheita de batata ou tomate subsequente ao período especificado no travessão anterior, e sob condição de o campo ter sido considerado livre de plantas espontâneas de batateira ou de tomateiro e de outras plantas hospedeiras do organismo, incluindo solanáceas infestantes, durante inspeções oficiais, pelo menos nos dois anos de cultura consecutivos anteriores à plantação,
 - no caso da batata, será permitida a produção de batata de semente ou de batata para consumo,
 - os tubérculos de batata colhidos ou as plantas de tomateiro, conforme adequado, deverão ser testados em conformidade com o procedimento referido no anexo II;
- b) Em todos os restantes campos do local de produção contaminado e sob condição de os organismos oficiais responsáveis obterem a garantia de que foi eliminado o risco de aparecimento de plantas espontâneas de batateira e de tomateiro e de outras plantas hospedeiras naturais do organismo incluindo solanáceas infestantes, quando apropriado:
- no ano de cultura subsequente ao da declaração de contaminação,
 - não serão plantados tubérculos, plantas ou sementes verdadeiras de batateira nem qualquer outra planta que possa constituir um hospedeiro do organismo,
 - ou
 - no caso de tubérculos de batata, só poderão ser plantados tubérculos de batata de semente certificada, unicamente para produção de batata de consumo,
 - no caso de plantas de tomateiro, só poderão ser plantadas, unicamente para produção de tomate, plantas de tomateiro obtidas de sementes que cumpram as exigências da Directiva 2000/29/CE;
- no segundo ano de cultura subsequente ao da declaração de contaminação,
- no caso da batata, só serão plantadas, para produção de batata de semente ou para consumo, batatas de semente certificadas ou oficialmente testadas para determinar a ausência do mal murcho e cultivadas sob controlo oficial em locais de produção à excepção dos enumerados em 4.1,
- no caso do tomate, só serão plantadas, para produção de plantas ou de tomate, plantas de tomateiro obtidas de sementes que cumpram as exigências da Directiva 2000/29/CE ou, no caso de propagação vegetativa, de plantas de tomateiro produzidas a partir dessas sementes e cultivadas sob controlo oficial em locais de produção à excepção dos enumerados em 4.1;
- pelo menos no terceiro ano de cultura subsequente ao da declaração de contaminação,
- no caso da batata, só serão plantadas, para produção de batata de semente ou batata de consumo, batatas de semente certificadas ou produzidas, sob controlo oficial, a partir de batatas de semente certificadas,
- no caso do tomate, só poderão ser plantadas, para produção de plantas ou de tomate, plantas de tomateiro obtidas de sementes que cumpram as exigências da Directiva 2000/29/CE ou plantas de tomateiro produzidas sob controlo oficial a partir dessas plantas;
- em cada um dos anos de cultivo referidos nos travessões anteriores serão tomadas medidas para eliminar as plantas espontâneas de batateira e outras plantas hospedeiras naturais do organismo, caso estejam presentes, e proceder-se-á, em alturas apropriadas, a uma inspeção oficial da cultura em desenvolvimento e, em cada campo de cultivo de batata, ao teste oficial das batatas colhidas, em conformidade com o procedimento estabelecido no anexo II;
- c) Imediatamente após a declaração de contaminação ao abrigo do n.º 1, alínea a), subalínea ii), do artigo 5.º, e após o primeiro ano de cultura subsequente:
- todas as máquinas e instalações de armazenamento do local de produção que estejam envolvidas na produção de batata ou tomate devem ser limpas e, quando necessário, desinfectadas através de métodos apropriados conforme especificado no ponto 3,
 - serão estabelecidos, quando necessário, controlos oficiais dos programas de irrigação e aspersão, que poderão conduzir à sua proibição, para evitar a dispersão do organismo;

- d) Numa unidade de produção de culturas protegidas declarada contaminada ao abrigo do n.º 1, alínea a), subalínea ii), do artigo 5.º, nos casos em que seja possível a total substituição do meio de cultura,
- não serão plantados tubérculos nem plantas ou sementes verdadeiras de batateira, nem nenhuma outra planta hospedeira do organismo, incluindo plantas e sementes de tomateiro, a não ser quando a unidade de produção tiver sido sujeita, sob supervisão oficial, a medidas destinadas a eliminar o organismo e a remover todo o material vegetal hospedeiro, incluindo, no mínimo, a renovação completa do meio de cultura e a limpeza e, quando necessário, desinfecção da unidade e de todo o equipamento, e quando os organismos oficiais responsáveis tiverem concedido a sua aprovação para fins de produção de batata ou de tomate,
- e
- para a produção de batata, apenas serão utilizadas batatas de semente certificadas ou minitubérculos ou microplantas provenientes de origens testadas,
 - para a produção de tomate, apenas serão utilizadas sementes que cumpram as exigências da Directiva 2000/29/CE ou, no caso de propagação vegetativa, plantas de tomateiro obtidas a partir dessas sementes e cultivadas sob controlo oficial,
 - serão estabelecidos, quando necessário, controlos oficiais dos programas de irrigação e aspersão, que poderão conduzir à sua proibição, para evitar a dispersão do organismo.

4.2. Dentro da zona demarcada, sem prejuízo das medidas definidas no ponto 4.1, os Estados-Membros deverão:

- a) Imediatamente após a declaração de contaminação, assegurar a limpeza e desinfecção, consoante for apropriado, de toda a maquinaria e armazéns das referidas instalações que estejam envolvidos na produção de batata ou tomate, utilizando métodos adequados, tal como disposto no ponto 3;
- b) Imediatamente, e pelo menos durante os três anos de cultura subsequentes à declaração de contaminação:
- ba) Nos casos em que a zona tenha sido demarcada ao abrigo do n.º 1, alínea a), subalínea iv), do artigo 5.º,
- garantir, através dos seus organismos oficiais responsáveis, o controlo das instalações em que se cultivem, armazenem ou manuseiem tubérculos de batata ou tomate, e também das instalações em que sejam utilizadas máquinas destinadas à produção de batata ou tomate sob contrato,
 - exigir, para todas as culturas de batata da zona, que só sejam plantadas batatas de semente certificadas ou sementes cultivadas sob controlo oficial, e que sejam analisadas após colheita as culturas de batata de semente efectuadas em locais de produção declarados como provavelmente contaminados nos termos do n.º 1, alínea a), subalínea iii), do artigo 5.º,
 - exigir que os lotes de batata de semente e de batata para consumo colhidos na zona sejam manuseados separadamente ou a intervenção de um sistema de limpeza e, quando necessário, desinfecção entre o manuseamento de lotes de batata de semente e de consumo,
 - exigir, para todas as culturas de tomate da zona, que só sejam plantadas plantas de tomateiro obtidas a partir de sementes que cumpram as exigências da Directiva 2000/29/CE ou, no caso de propagação vegetativa, de plantas de tomateiro produzidas a partir dessas sementes e cultivadas sob controlo oficial,
 - realizar uma prospecção oficial, nos termos do n.º 1 do artigo 2.º;
- bb) Nos casos em que as águas superficiais tenham sido declaradas contaminadas ao abrigo do n.º 1, alínea c), subalínea ii), do artigo 5.º, ou incluídas entre os elementos que eventualmente possam contribuir para a dispersão do organismo, nos termos do ponto 2 do anexo V,
- realizar, nas alturas apropriadas, uma prospecção anual, incluindo uma amostragem das águas superficiais e, quando necessário, de solanáceas hospedeiras que se encontrem junto dos pontos de água e, para os materiais vegetais da lista e noutros casos, a realização de testes de acordo com os métodos pertinentes previstos no anexo II,

- estabelecer controlos oficiais dos programas de irrigação e aspersão, incluindo a proibição de utilização das águas declaradas contaminadas para irrigação ou aspersão dos materiais vegetais da lista e, quando necessário, de outras plantas hospedeiras, para evitar a dispersão do organismo. Essa proibição poderá ser objecto de uma revisão com base nos resultados da citada prospecção anual e as declarações revogadas, sob condição de os organismos oficiais responsáveis obterem a garantia de que as águas superficiais já não se encontram contaminadas. A utilização das águas sujeitas a proibição poderá ser permitida, mediante controlo oficial, para irrigação ou aspersão de plantas hospedeiras, nos casos em que haja recurso a técnicas oficialmente aprovadas para eliminação do organismo e prevenção da sua dispersão,
 - nos casos em que haja contaminação de descargas de resíduos líquidos, estabelecer controlos oficiais da eliminação de descargas de resíduos sólidos ou líquidos provenientes de instalações de transformação industrial ou de embalagem que manuseiem materiais vegetais da lista;
- c) Estabelecer, quando necessário, um programa de substituição de todos os lotes de batata de semente ao longo de um período de tempo adequado.
-

ANEXO VII

Os métodos de eliminação de resíduos oficialmente aprovados a que se refere o ponto 1 do anexo VI deverão obedecer às seguintes disposições, por forma a obviar a quaisquer riscos identificáveis de propagação do organismo:

- i) Os resíduos de batata e tomate (incluindo cascas de batata e batatas e tomates rejeitados) e qualquer outro resíduo sólido associado à batata e ao tomate (incluindo terra, pedras e outros detritos) serão sujeitos a:
- eliminação num local de eliminação de resíduos destinado especificamente a esse efeito e aprovado oficialmente em que não existam riscos identificáveis de fuga do organismo para o meio ambiente, por exemplo através da escorrência para terras agrícolas ou de contacto com pontos de água que possam ser utilizados para a irrigação de terras agrícolas. Os resíduos serão directamente transportados para esses locais em condições de confinamento de forma a que não exista risco de perda de resíduos,
 - ou
 - incineração,
 - ou
 - outras medidas, desde que se tenha concluído que não existe qualquer risco identificável de dispersão do organismo; essas medidas devem ser notificadas à Comissão e aos demais Estados-Membros.
- ii) Resíduos líquidos: antes de serem eliminados, os resíduos líquidos que contenham sólidos em suspensão serão sujeitos a processos de filtração ou decantação para remoção dos mesmos. Os sólidos removidos serão eliminados em conformidade com a alínea i).

Os resíduos líquidos serão depois:

- aquecidos a, no mínimo, 60 °C em todo o seu volume durante pelo menos 30 minutos antes de serem eliminados,
- ou
- eliminados de outro modo, sujeito a aprovação e controlo oficial, de forma a que não exista qualquer risco identificável de que os resíduos venham a entrar em contacto com terras agrícolas ou com pontos de água que possam ser utilizados para a irrigação de terras agrícolas. Os pormenores relativos a esse método serão notificados aos restantes Estados-Membros e à Comissão.

As opções descritas no presente anexo são igualmente aplicáveis aos resíduos associados ao manuseamento, à eliminação e à transformação de lotes contaminados.»
