



# MONITORUL OFICIAL

## AL

# ROMÂNIEI

Anul 175 (XIX) — Nr. 417 bis

PARTEA I  
LEGI, DECRETE, HOTĂRÂRI ȘI ALTE ACTE

Vineri, 22 iunie 2007

### SUMAR

Pagina

Anexele nr. I—V la Ordinul ministrului agriculturii și dezvoltării rurale nr. 387/2007 pentru modificarea și completarea Ordinului ministrului agriculturii, pădurilor și dezvoltării rurale nr. 912/2004 privind controlul putregaiului inelar al cartofului, produs de <i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i> .....	2–32
---	------

**ACTE ALE ORGANELOR DE SPECIALITATE  
ALE ADMINISTRAȚIEI PUBLICE CENTRALE**  
MINISTERUL AGRICULTURII ȘI DEZVOLTĂRII RURALE

**ORDIN**

**pentru modificarea și completarea Ordinului ministrului agriculturii, pădurilor  
și dezvoltării rurale nr. 912/2004 privind controlul putregaiului inelar  
al cartofului, produs de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*\*)**

În temeiul prevederilor art. 5 din Ordonanța Guvernului nr. 136/2000 privind măsurile de protecție împotriva introducerii și răspândirii organismelor de carantină dăunătoare plantelor sau produselor vegetale în România, cu modificările și completările ulterioare,

în temeiul Hotărârii Guvernului nr. 385/2007 privind organizarea și funcționarea Ministerului Agriculturii și Dezvoltării Rurale,

văzând Referatul de aprobare nr. 292.399 din 18 mai 2007 al Agenției Naționale Fitosanitare din cadrul Ministerului Agriculturii și Dezvoltării Rurale,

**ministrul agriculturii și dezvoltării rurale** emite prezentul ordin.

**Art. I.** — Ordinul ministrului agriculturii, pădurilor și dezvoltării rurale nr. 912/2004 privind controlul putregaiului inelar al cartofului, produs de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, publicat în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 127 și 127 bis din 9 februarie 2005, se modifică și se completează după cum urmează:

1. **Anexele nr. I—IV se modifică și se înlocuiesc cu anexele nr. I—IV care fac parte integrantă din prezentul ordin.**

2. **După anexa nr. IV se introduce o nouă anexă, anexa nr. V, care face parte integrantă din prezentul ordin.**

**Art. II.** — Prezentul ordin va fi publicat în Monitorul Oficial al României, Partea I.

**Art. III.** — Prezentul ordin transpune prevederile Directivei Consiliului 2006/56/CEE din 12 iunie 2006, care amendează anexele Directivei Consiliului 93/85/CEE privind controlul putregaiului inelar al cartofului.

Ministrul agriculturii și dezvoltării rurale,  
**Decebal Traian Remeș**

București, 21 mai 2007.  
Nr. 387.

ANEXA Nr. I

**PROTOCOL**

**de testare în vederea diagnosticării, detectării și identificării agentului responsabil  
de putregaiul inelar al cartofului, *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis *et al.* ssp.  
*sepedonicus* (Spieckermann și Kotthoff) Davis *et al.***

**DOMENIU DE APLICARE AL PROTOCOLULUI DE TESTARE**

Protocolul prezentat în continuare descrie diferitele etape ce trebuie urmate pentru:

- (i) diagnosticarea putregaiului inelar al cartofului în tuberculi și plante de cartof;
- (ii) detectarea bacteriei *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* pe probe de tuberculi și plante de cartof;
- (iii) identificarea bacteriei *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*

**PRINCIPII GENERALE**

Protocolele optimizate pentru diversele metode, reactivii validați și modalitățile de preparare a materialului necesar pentru teste și pentru controale figurează în apendicii din prezenta anexă. În apendicele 1 din prezenta anexă se furnizează o listă a laboratoarelor incluse pentru optimizarea și validarea protocolelor.

Deoarece protocolele implică detectarea unui organism dăunător de carantină și includ utilizarea culturilor viabile de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* ca materiale de control, este necesar ca procedurile să se desfășoare în condiții adecvate de carantină, cu instalații corespunzătoare de eliminare a deșeurilor și cu respectarea cerințelor referitoare la licențele corespunzătoare emise de autoritățile oficiale responsabile pentru carantină.

\*) Ordinul nr. 387/2007 a fost publicat în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 417 din 22 iunie 2007 și este reprodus și în acest număr bis.

Parametrii testelor trebuie să garanteze o detectare coerentă și reproductibilă a nivelurilor de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* la pragurile stabilite pentru metodele selecționate. Este necesară pregătirea exactă a marilor pozitivi.

Realizarea testelor în funcție de pragurile cerute implică, de asemenea, stabilirea parametrilor corecți, întreținerea și calibrarea echipamentelor, manevrarea și conservarea atentă a reactivilor și toate măsurile care vizează împiedicarea contaminării între probe, de exemplu, separarea marilor pozitivi de probele de testat. Trebuie aplicate norme de control al calității pentru a evita apariția oricărei greșeli, în special de ordin administrativ, în etichetare și în documentație.

Apariția suspectată a unui focar, conform art. 4 alin. (2), implică o reacție pozitivă la testele de diagnostic sau de depistare efectuate pe o probă, după cum se indică în diagrame.

În cazul în care primul test de depistare [testul de imunofluorescență (IF) sau testul reacției de polimerizare în lanț (PCR)/testul de hibridizare fluorescență in situ (FISH)] este pozitiv, există o suspiciune de contaminare cu *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* și trebuie efectuat un al doilea test de depistare. În cazul în care și al doilea test de depistare este pozitiv, suspiciunea este confirmată (aparitie suspectată) și testele trebuie continuate în conformitate cu protocolul. În cazul în care al doilea test de depistare este negativ, proba este considerată necontaminată cu *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

Reacția pozitivă la testul IF, prevăzută la art. 4 alin. (2) din ordin, este așadar definită ca o reacție pozitivă la testul IF, confirmată de un al doilea test de depistare (PCR/FISH).

Prezența confirmată, prevăzută la art. 5 alin. (1) din ordin, implică izolarea și identificarea unei culturi pure de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, cu confirmarea patogenității.

## 1. PREZENTAREA DIAGRAMEI FUNCȚIONALE

### 1.1. Protocol de detectare în vederea diagnosticării putregaiului inelar al cartofului în tuberculi și plante de cartof care prezintă simptome ale bolii (vezi diagrama 1)

Procedura de testare vizează tuberculi și plantele de cartof care prezintă simptome caracteristice veștejirii bacteriene sau care prezintă suspiciunea prezenței bolii respective. Procedura prevede un test rapid de depistare, izolarea organismului patogen plecând de la țesutul vascular infectat pe medii de diagnostic și, în cazul unui rezultat pozitiv, identificarea culturii ca fiind *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

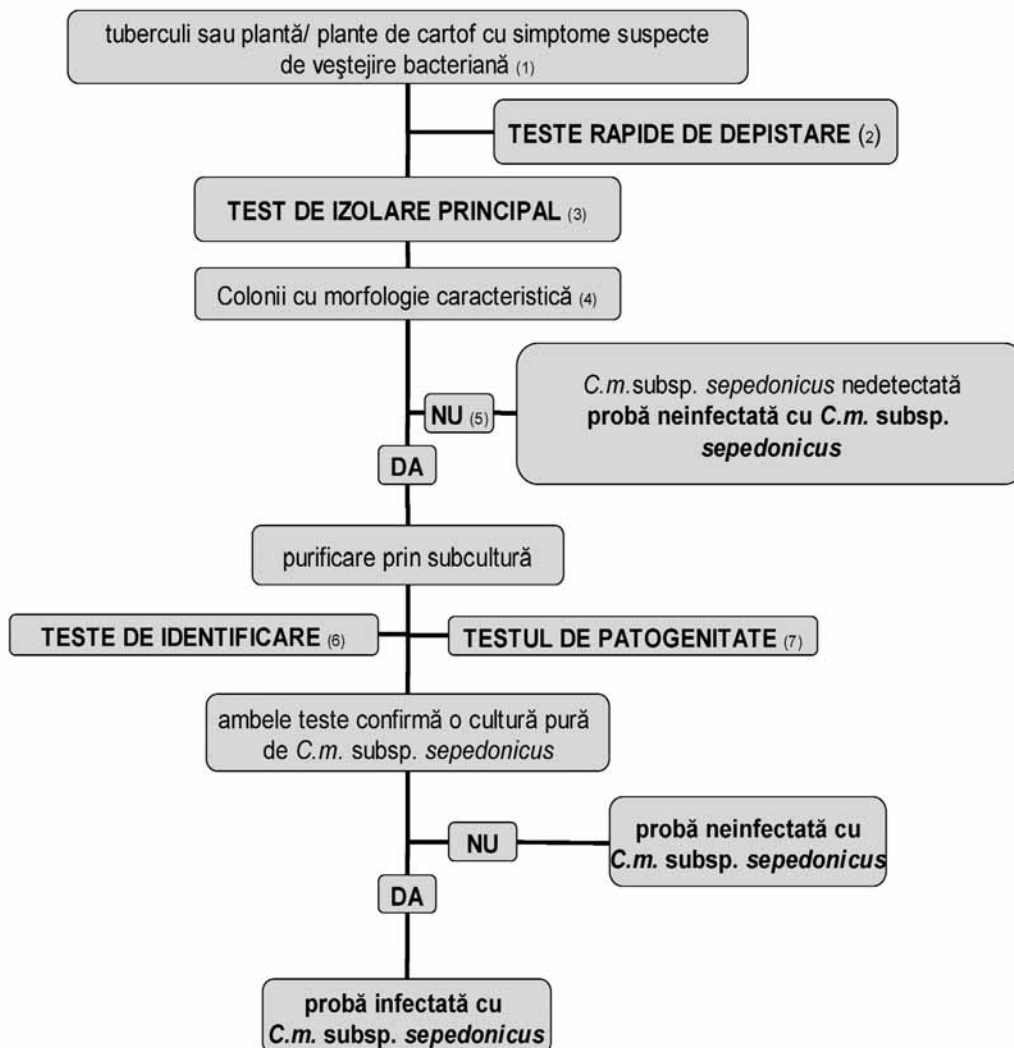


DIAGRAMA 1

<sup>1</sup> Descrierea simptomelor figurează la pct. 2.

<sup>2</sup> Testele adecvate sunt:

- testul IF (pct. 4);
- testul PCR (pct. 6);
- testul FISH (pct 5).

<sup>3</sup> Deși izolarea prin diluție și însămânțare pe medii de cultură a agentului patogen provenit din materialul vegetal care prezintă simptome caracteristice este o sarcină simplă, însămânțarea pe mediul de cultură poate să dea rezultate eronate în stadiile avansate de infecție. Bacteriile saprofite care se dezvoltă pe un țesut bolnav pot să se multiplieze mult mai repede decât agentul patogen sau să îi inhibe creșterea pe mediul de izolare. Așadar, se recomandă să se utilizeze în același timp medii neselective și selective, de preferință de tip MTNA (pct. 8) sau să se recurgă la testul biologic (pct. 7).

<sup>4</sup> Profilul morfologic al unei colonii caracteristice este prezentat la pct. 8.

<sup>5</sup> Atunci când testul de izolare este negativ, în ciuda existenței simptomelor caracteristice ale bolii, trebuie repetată izolarea.

<sup>6</sup> Se poate identifica în mod sigur o cultură pură de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, utilizând testele enumerate la pct. 9.

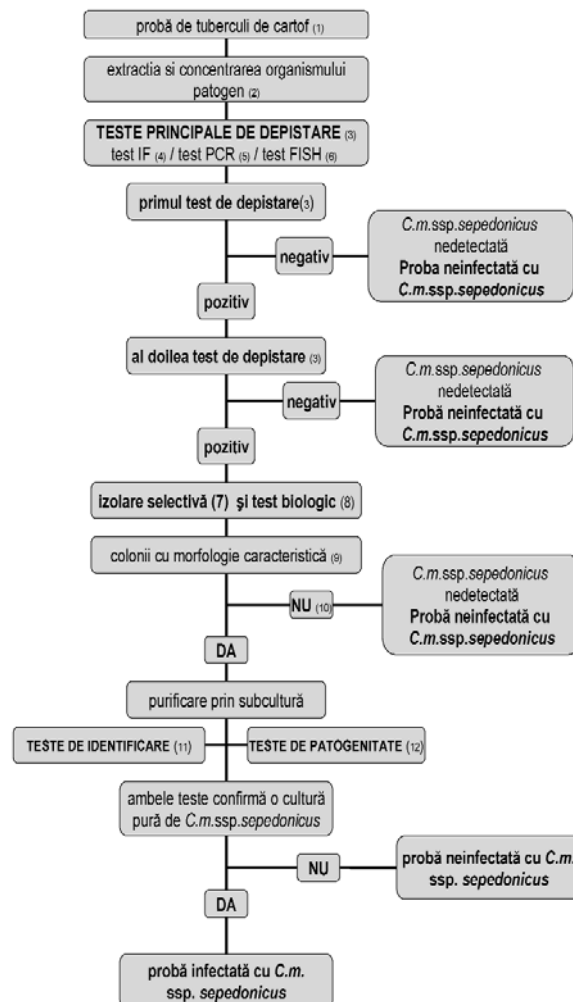
<sup>7</sup> Testul de patogenitate este descris la pct. 10.

**1.2.1. Protocol de detectare și de identificare a bacteriei *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* pe probe de tuberculi de cartof fără simptome (vezi diagrama 2)**

#### Principiu

Procedura de testare vizează detectarea infecțiilor latente ale tuberculilor de cartof. Orice rezultat pozitiv la cel puțin două teste de depistare, bazate pe principii biologice diferite, trebuie completat cu izolarea organismului patogen, urmată, în caz de izolare a coloniilor caracteristice, de confirmarea unei culturi pure ca fiind *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Rezultatul pozitiv al unui singur test de depistare nu este suficient pentru ca proba să fie considerată suspectă.

Testele de depistare și testele de izolare trebuie să permită praguri de detectare cuprinse între  $10^3$  și  $10^4$  celule/mL în depozitul resuspendat, inclusiv în martorii pozitivi din fiecare serie de teste.



## DIAGRAMA 2

<sup>1</sup> Dimensiunea probei standard este de 200 de tuberculi, deși procedura poate fi aplicată și unor probe mai mici, în cazul în care nu se dispune de 200 de tuberculi.

<sup>2</sup> Extracția organismului patogen și metodele de concentrare sunt descrise la pct. 3.1.

<sup>3</sup> În cazul în care cel puțin două teste bazate pe principii biologice diferite sunt pozitive, trebuie să se efectueze izolarea și confirmarea. Se va realiza cel puțin un test de depistare. În cazul în care testul respectiv este negativ, proba se consideră negativă. În cazul în care testul este pozitiv, trebuie să se efectueze cel puțin un al doilea test de depistare, bazat pe principii biologice diferite, pentru a verifica primul rezultat pozitiv. În cazul în care al doilea test sau următoarele sunt negative, proba este considerată negativă. În acest caz nu este necesară efectuarea altor teste.

<sup>4</sup> Testul IF

Se utilizează întotdeauna un anticorp policlonal pentru testele IF. Se poate obține o specificitate mai mare (vezi pct. 4), asociind anticorpului menționat anticorpi monoclonali suplimentari.

<sup>5</sup> Testul PCR.

Se utilizează reactivi și protocoale PCR validate în mod corespunzător (vezi pct. 6).

<sup>6</sup> Testul FISH.

Se utilizează reactivi și protocoale validate (vezi pct. 5).

<sup>7</sup> Izolare selectivă

Asociată cu utilizarea unui mediu MTNA sau NCP-88 și a unei diluări la 1/100 din sediment resuspendat, izolarea selectivă constituie, în numeroase cazuri, o metodă bună de izolare directă a bacteriei *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Coloniile caracteristice se pot obține într-o perioadă de 3 până la 10 zile de la însămânțare. Atunci este posibil să se efectueze purificarea și identificarea agentului patogen. Pentru a profita din plin de posibilitățile oferite de testul în cauză, trebuie să se pregătească cu grijă conurile de cartof prelevate de la nivelul hilului pentru a evita contaminarea cu bacterii secundare legate de tubercul, care constituie organisme concurente ale bacteriei *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* pe mediul de cultură și sunt susceptibile de a înlocui agentul patogen menționat. În cazul obținerii unui rezultat eronat la testul de însămânțare, izolarea trebuie efectuată din plantele utilizate pentru testul biologic (vezi pct. 8).

<sup>8</sup> Testul biologic este utilizat pentru izolarea bacteriei *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* din extractele de cartof, prin îmbogățire selectivă în plante de vinete (*Solanum melongena*). Sunt necesare condiții optime de incubare, în conformitate cu specificațiile procedurii în cauză. Bacteriile care au efect inhibitor asupra bacteriei *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* în prezența unui mediu MTNA sau NCP-88 nu riscă să afecteze desfășurarea testului menționat (vezi pct. 7).

<sup>9</sup> Profilul morfologic al unei colonii caracteristice este prezentat la pct 8.

<sup>10</sup> Însămânțarea pe mediul de cultură sau testele biologice pot fi eronate din cauza concurenței sau a efectului inhibitor al bacteriilor saprofite. În cazul în care testele de depistare dau rezultate pozitive, dar testele de izolare sunt negative, trebuie repetate testele de izolare din același sediment sau cu ajutorul unor noi țesuturi vasculare prelevate din apropierea hilului de pe tuberculi tăiați provenind din aceeași probă și, după caz, trebuie testate probe suplimentare.

<sup>11</sup> Se pot identifica în mod sigur culturi pure de izolați presupuși de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, utilizând testele enumerate la pct. 9.

<sup>12</sup> Testul patogenității este descris la pct. 10.

**1.3. Protocol de detectare și de identificare a bacteriei *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* pe probe de plante de cartof fără simptome (vezi diagrama 3)**

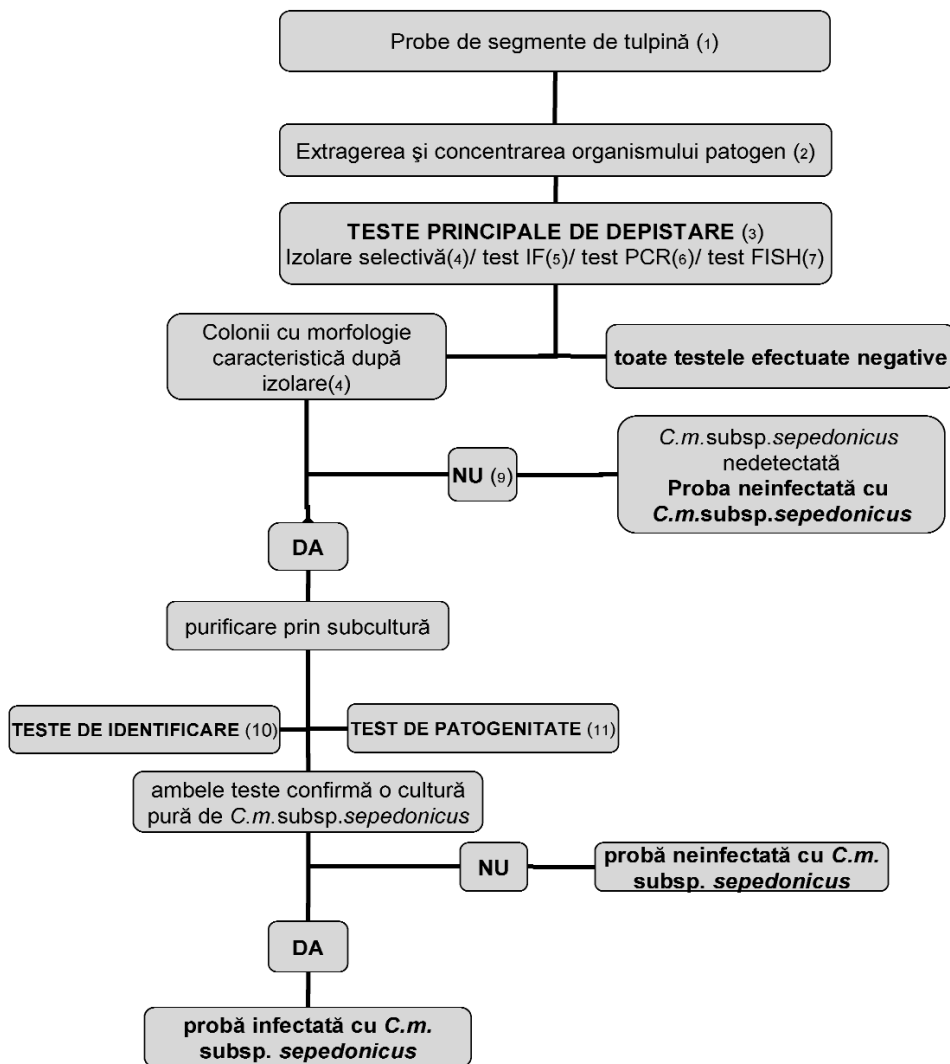


DIAGRAMA 3

<sup>1</sup> Vezi pct. 3.2 pentru dimensiunea recomandată a probelor.

<sup>2</sup> Extracția organismului patogen și metodele de concentrare sunt descrise la pct. 3.2.

<sup>3</sup> În cazul în care cel puțin două teste bazate pe principii biologice diferite sunt pozitive, trebuie efectuate izolarea și confirmarea. Se realizează cel puțin un test de depistare. În cazul în care testul respectiv este negativ, proba se consideră negativă. În cazul în care testul este pozitiv, trebuie să se efectueze cel puțin un al doilea test de depistare, bazat pe principii biologice diferite, pentru a verifica primul rezultat pozitiv. În cazul în care al doilea test sau următoarele sunt negative, proba este considerată negativă. În acest caz nu este necesară efectuarea altor teste.

<sup>4</sup> Testul de izolare selectivă și profilul morfologic al unei colonii caracteristice sunt prezentate la pct. 8.

<sup>5</sup> Testul IF este descris la pct 4.

<sup>6</sup> Testele PCR sunt descrise la pct. 6.

<sup>7</sup> Testul FISH este descris la pct. 5.

<sup>8</sup> Testul biologic este descris la pct. 7.

<sup>9</sup> Izolarea pe mediu de cultură sau testele biologice pot fi eronate din cauza concurenței sau a efectului inhibitor al bacteriilor saprofite. În cazul în care testele de depistare dau rezultate pozitive, dar testele de izolare sunt negative, trebuie repetate testele de izolare și, dacă este cazul, trebuie testate probe suplimentare.

<sup>10</sup> Se pot identifica în mod sigur culturi pure de izolați presupuși de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, utilizându-se testele enumerate la pct. 9.

<sup>11</sup> Testul de patogenitate este descris la pct. 10.

## 2. EXAMINAREA VIZUALĂ A SIMPTOMELOR PUTREGAIULUI INELAR AL CARTOFULUI

### 2.1. Plante de cartof

În contextul climatic european se întâmplă rareori ca simptomele să fie observate pe teren, iar atunci când este cazul, acest lucru se întâmplă numai la sfârșitul sezonului. Adesea simptomele pot fi mascate de cele ale altor boli, de vătămări mecanice sau îmbătrânire ori pot fi

confundate cu acestea. Așadar, simptomele pot trece cu ușurință neobservate în momentul inspecției pe teren. Simptomele veștejirii sunt foarte diferite de cele ce caracterizează putregaiul inelar al cartofului. În general, primul simptom progresează într-adevăr lent și se limitează inițial la marginea frunzelor. În cazul celui de-al doilea, frunzele tinere infectate continuă să crească, într-o manieră mai puțin obișnuită, ceea ce dă frunzelor un aspect neregulat. Frunzele plantelor atinse de obstrucția țesuturilor vasculare situate mai jos pe tulpină prezintă adesea între nervuri pete clorotice de culoare galbenă sau portocalie. Se întâmplă ca frunzulițele, frunzele și chiar tulpinile infectate să moară. Deseori, frunzele și tuberculii se micșorează. Ocazional se constată o atrofiere a plantelor. Ilustrații colorate ale unor simptome se pot găsi la adresa: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

## 2.2. Tuberculi de cartof

Primele simptome apar mai ales în apropierea hilului și dau un aspect ușor sticlos sau translucid țesutului, fără înmuiere în jurul sistemului vascular. Inelul vascular poate prezenta, la nivelul hilului, o culoare mai închisă decât de obicei. Primul simptom, ușor de identificat, este o îngălbenire a inelului vascular, ceea ce conduce la eliminarea din vase a unui exudat cu aspect cremos la presarea ușoară a tuberculului. Exudatul respectiv conține milioane de bacterii. Poate apărea o brunificare a țesutului vascular și în acest stadiu simptomele tuberculului sunt asemănătoare cu cele ale veștejirii bacteriene produse de bacteria *Ralstonia solanacearum*. Într-o primă fază, simptomele pot să se limiteze la o porțiune a inelului care nu este neapărat situată în apropierea hilului, dar ulterior aceste simptome vor cuprinde treptat întreg inelul. Pe măsură ce infecția progresează, țesuturile vasculare sunt distruse, iar cortexul exterior se poate separa de cortexul interior. În stadiile avansate ale infecției, la suprafața tuberculului apar fisuri cu marginile adesea colorate în roșu brun. În multe cazuri observate recent în Europa se constată o putrezire simultană a cortexului central și a inelului vascular, care antrenează o infecție secundară cu apariția de cavități interne și necroză. O infecție fungică sau bacteriană secundară poate masca simptomele și poate fi dificil și chiar imposibil să se distingă simptomele avansate ale putregaiului inelar al cartofului de simptomele altor putregaiuri ale tuberculilor. Nu trebuie excluse nici formele fără simptome. Ilustrații colorate ale unor simptome se pot găsi la adresa: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

## 3. PREPARAREA PROBEI

### 3.1. Tuberculi de cartof

#### NOTĂ:

— Dimensiunea probei standard este de 200 de tuberculi per test. Prelevarea mai multor probe implică un număr mai mare de teste. Un număr mai mare de tuberculi în probă va cauza inhibiție sau o interpretare dificilă a rezultatelor. În cazul în care nu se dispune de un număr atât de mare de tuberculi, procedura poate fi aplicată fără dificultate pe probe mai mici de 200 de tuberculi.

— Validarea tuturor metodelor de detectare descrise în continuare se bazează pe teste realizate pe probe de 200 de tuberculi.

— Extractul de cartof descris în continuare mai poate fi utilizat și pentru a detecta prezența bacteriei responsabile de veștejirea bacteriană a cartofului, *Ralstonia solanacearum*.

Tratarea probei — etapa facultativă:

Se spală tuberculii. Între probe se aplică substanțe dezinfectante (compuși clorurați pentru eliminarea ADN-ului patogen, atunci când trebuie utilizat testul PCR) și detergenți corespunzători. Se usucă tuberculii cu aer. Procedura de spălare menționată este utilă (dar nu este neapărat obligatorie) în special pentru probele care conțin sol în exces și în cazul în care trebuie efectuat un test PCR sau o procedură de izolare directă.

3.1.1. Cu ajutorul unui bisturiu sau al unui cuțit pentru legume, curat și dezinfectat, se cojește fiecare tubercul la nivelul hilului până la apariția țesutului vascular. Se decupează cu atenție un mic con de țesut vascular la nivelul hilului, avându-se grijă să se preleve cât mai puțin țesut nevascular posibil (vezi site-ul web accesibil la adresa: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

#### NOTĂ:

Dacă este cazul, tuberculii care prezintă simptome suspecte de putregai inelar se testează separat.

În cazul în care se observă simptome suspecte de putregai inelar în momentul prelevării conului de la nivelul hilului, trebuie să se efectueze o examinare vizuală a tuberculului, după ce a fost tăiat în apropierea hilului. Orice tubercul tăiat care prezintă simptome suspecte trebuie suberificat timp de două zile la temperatura mediului ambiant, apoi păstrat în condiții de carantină (la o temperatură cuprinsă între 4 și 10°C) până la efectuarea tuturor testelor. Toți tuberculii din probă (inclusiv cei care prezintă simptome suspecte) trebuie păstrați în conformitate cu prevederile din anexa nr. II.

3.1.2. Se prelevă conurile în recipiente noi, de unică folosință, care să se poată închide și/sau sigila (în cazul recipientelor refozitate, acestea se vor curăța și dezinfecta integral cu ajutorul compușilor clorurați). Este preferabil ca tratarea conurilor să se efectueze imediat. În caz contrar, conurile se depozitează în recipient, fără a se adăuga tampon, și fie se refrigerază pentru o perioadă mai mică de 72 de ore, fie se conservă la temperatura mediului ambiant pentru

o perioadă mai scurtă de 24 de ore. Uscarea și suberificarea, precum și dezvoltarea saprofiților în momentul depozitării conurilor pot împiedica detectarea agentului responsabil de putregaiul inelar.

3.1.3. Conurile se tratează în conformitate cu una dintre următoarele proceduri:

a) se acoperă conurile cu un volum suficient de tampon de extracție (aproximativ 40 mL; vezi apendicele 3) și se așază pe un agitator rotativ (50 și 100 ture/minut) timp de 4 ore, la o temperatură mai mică de 24°C, sau timp de 16–24 de ore, în cazul în care sunt refrigerati; sau

b) se omogenizează conurile cu o cantitate suficientă de tampon de extracție (aproximativ 40 mL; vezi apendicele 3) fie într-un mixer (de exemplu, Waring sau Ultra Thurax), fie zdrobindu-le cu un ciocan din cauciuc sau cu un alt dispozitiv de zdrobire potrivit (de exemplu, Homex), într-o pungă de macerare de unică folosință, sigilată (de exemplu, de tip Stomacher sau „Bioreba strong guage polythene“ de 150 mm x 250 mm, sterilizată cu radiații ionizante).

NOTĂ:

Există un risc ridicat de contaminări încrucișate ale probelor atunci când acestea sunt omogenizate folosindu-se un mixer. Se vor lua măsuri de precauție pentru a se evita orice vaporizare sau vărsare în timpul procesului de extracție. Se va asigura folosirea unor lame de mixer și a unor vase proaspăt sterilizate pentru fiecare probă. În cazul folosirii testului PCR, se va evita orice transport de ADN în recipientele sau în aparatele de zdrobire. În cazul în care se recurge la testul PCR, se recomandă zdrobirea în pungi de unică folosință și utilizarea tuburilor de unică folosință.

3.1.4. Se decantează supernatantul. În cazul în care lichidul este prea tulbure, se limpește prin centrifugare la viteză redusă (la maximum 180 g timp de 10 minute, la o temperatură de 4–10°C) sau prin filtrare în vid (40–100 μm), spălându-se suplimentar filtrul cu 10 mL tampon de extracție (vezi apendicele 3).

3.1.5. Se concentrează fracțiunea bacteriană prin centrifugare la viteza de 7.000 g timp de 15 minute (sau de 10.000 g timp de 10 minute), la o temperatură cuprinsă între 4 și 10°C, apoi se elimină supernatantul, fără a agita depozitul.

3.1.6. Se resuspendă depozitul în 1,5 mL tampon de sedimentare (vezi apendicele 3). Se utilizează 500 μL pentru testele de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, 500 μL pentru testele de *Ralstonia solanacearum* și 500 μL ca alicot de referință. La cei 500 μL alicot de referință se adaugă glicerol steril 10–25% (în volum). Alicotul rămas se agită prin vortexare și se depozitează la o temperatură cuprinsă între –16 și –24°C (săptămâni) sau între –68 și –86°C (luni). În timpul testelor, alicotii se păstrează la o temperatură cuprinsă între 4–10°C.

Nu sunt recomandate congelările și decongelările repetate.

În cazul în care extractul trebuie transportat, se va păstra într-o ladă frigorifică pentru o perioadă de 24–48 de ore.

3.1.7. Pentru a evita contaminarea, este necesar ca toți martorii pozitivi și toate probele de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* să fie tratate separat, atât pentru testele de IF, cât și pentru toate celelalte teste.

## 3.2. Plante de cartof

NOTĂ:

Pentru a detecta populațiile latente de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* este recomandabil să se testeze probe mixte. Procedura poate fi aplicată cu ușurință pentru probele mixte care conțin până la 200 părți de tulpini. (Atunci când se efectuează anchete, anchetele respective trebuie să se bazeze pe o probă reprezentativă din punct de vedere statistic a populației vegetale examinate.)

3.2.1. Cu ajutorul unui cuțit sau al unei foarfeci de grădină, curate și dezinfectate, se taie un segment de unu-doi centimetri de la baza fiecărei tulpini, chiar deasupra solului.

Fragmentele de tulpini se dezinfectează rapid cu etanol 70% și se usucă imediat cu hârtie de filtru.

Se colectează fragmentele de tulpini într-un recipient steril închis, respectându-se procedura de prelevare expusă în continuare.

3.2.2. Fragmentele de tulpini se tratează urmându-se una dintre următoarele proceduri:

a) se acoperă fragmentele de tulpină cu un volum suficient de tampon de extracție (aproximativ 40 mL; vezi apendicele 3) și se așază pe un agitator rotativ (între 50 și 100 ture/minut) timp de 4 ore, la o temperatură mai mică de 24°C, sau timp de 16–24 de ore, în cazul în care sunt refrigerate; sau

b) fragmentele se zdrobesc imediat într-o pungă de macerare rezistentă (de exemplu, Stomacher sau Bioreba), cu o cantitate adecvată de tampon de extracție (vezi apendicele 3), folosindu-se un ciocan de cauciuc sau un alt dispozitiv de zdrobire corespunzător (de exemplu, Homex). În caz contrar, fragmentele trebuie să fie păstrate la frigider maximum 72 de ore sau la temperatura mediului ambiant maximum 24 de ore.

3.2.3. După o sedimentare de 15 minute, se decantează supernatantul.

3.2.4. De obicei, nu este necesar să se efectueze o nouă limpezire a extractului sau a concentrației fracțiunii bacteriene; cu toate acestea, limpezirea se poate efectua prin filtrare și/sau centrifugare, în conformitate cu metoda descrisă la pct. 3.1.4–3.1.6.



3.2.5. Se separă extractul de probă pur/concentrat în două părți egale. Una dintre părți se păstrează pe toată durata testului la o temperatură de 4–10°C, iar cealaltă se depozitează la o temperatură cuprinsă între –16 și –24°C (săptămâni) sau între –68 și –86°C (luni), după ce s-a adăugat în prealabil o cantitate de glicerol steril 10–25% (în volum), pentru cazurile în care va fi necesară efectuarea unor testări suplimentare.

#### 4. TESTUL DE IMUNOFLUORESCENȚĂ (IF)

##### Principiu

Ținându-se seama de capacitatea sa recunoscută de a atinge cerințele solicitate, se recomandă utilizarea testului IF ca principal test de depistare.

În cazul în care testul IF este utilizat ca principal test de depistare și rezultatul său este unul pozitiv, trebuie să se efectueze un test PCR sau FISH ca test secundar. În cazul în care testul IF este folosit ca test secundar, iar rezultatul său este pozitiv, analiza trebuie completată cu teste suplimentare, în conformitate cu indicațiile din diagrama funcțională.

##### NOTĂ:

Atunci când testul IF se utilizează ca principal test de depistare, se folosesc întotdeauna anticorpi policlonali. Atunci când testul IF efectuat cu anticorpi policlonali dă un rezultat pozitiv, se efectuează un test suplimentar cu anticorpi monoclonali, test ce are o specificitate mai mare și o sensibilitate mai mică.

Trebuie să se folosească anticorpii unei tulpini de referință a bacteriei *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Se recomandă să se determine titrul pentru fiecare nou lot de anticorpi. Titrul se definește ca fiind cea mai înaltă diluție la care se obține o reacție optimă, atunci când se testează o suspensie care conține între  $10^5$  și  $10^6$  celule per mL a unei tulpini omoloage de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, folosindu-se un conjugat adecvat de izotiocianat de fluoresceină (FITC), în conformitate cu recomandările producătorului. Soluția brută de anticorpi policlonali sau monoclonali trebuie să aibă un titru IF de cel puțin 1:2.000. În momentul efectuării testului, diluția/diluțiile de lucru a/ale anticorpilor trebuie să fie aproximativ egală/egale cu titrul. Se folosesc anticorpi validați (vezi site-ul web la adresa: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Testul trebuie efectuat pe extracte de probă proaspăt preparate. Dacă este cazul, acesta poate fi efectuat cu succes și pe extracte conservate cu glicerol, la o temperatură cuprinsă între –68 și –86°C. Glicerolul poate fi separat de probă prin adăugarea unui mL de tampon de sedimentare (vezi apendicele 3), urmat de recentrifugare timp de 15 minute la 7.000 g și resuspendare în același volum de tampon de sedimentare. Acest lucru este rareori necesar, în special atunci când proba este fixată pe lamă prin flambare (vezi pct. 2.2).

Se pregătesc lame-martor pozitive distincte, utilizându-se tulpini omoloage sau oricare altă tulpină de referință a bacteriei *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, obținute dintr-o suspensie de extract de cartof, așa cum se specifică în apendicele 2 și, opțional, într-un tampon.

Acolo unde este posibil, ar trebui să se utilizeze pe aceeași lamă un martor provenit din țesut infectat în mod natural (conservat prin liofilizare sau congelare la temperaturi cuprinse între –16°C și –24°C).

Ca martori negativi se folosesc alicoji din extract de probă care au fost găsiți negativi la testare.

Se utilizează lame de microscop cu multe godeuri, de preferință 10 godeuri, fiecare godeu având un diametru minim de 6 mm.

Controalele se testează la fel ca probele.

##### 4.1. Lamele se prepară folosindu-se una dintre următoarele metode:

(i) pentru sedimentele cu conținut relativ redus de amidon:

se pipetează în primul godeu un volum standard (15  $\mu$ L în godeurile de 6 mm; pentru godeurile cu un diametru mai mare se pipetează o cantitate mai mare) dintr-o diluție de 1/100 de sediment de cartof resuspendat. Apoi se pipetează un volum similar de sediment nediluat (1/1) în godeurile rămase de pe acel rând. Rândul următor poate fi folosit ca duplicat sau poate servi pentru a doua probă, așa cum este indicat în figura 1;

(ii) alte sedimente:

se prepară diluții zecimale (1/10 și 1/100) din sedimentul resuspendat în tampon de sedimentare. Se pipetează pe primul rând de godeuri un volum standard (15  $\mu$ L în godeurile de 6 mm; pentru godeurile cu un diametru mai mare se pipetează un volum mai mare) de sediment resuspendat și fiecare diluție. Șirul următor poate fi folosit ca duplicat sau poate servi pentru o a doua probă, așa cum este indicat în figura 2.

4.2. Se usucă picăturile la temperatura mediului ambiant sau prin încălzire la temperaturi cuprinse între 40°C și 45°C. Celulele bacteriene se fixează pe lamă prin încălzire (15 minute la 60°C), prin flambare, cu ajutorul etanolului 95%, sau urmând instrucțiunile specifice ale furnizorilor de anticorpi.

Dacă este necesar, lamele fixate pot fi păstrate la frigider într-o cutie desicator pentru cel mult 3 luni înainte de efectuarea unui alt test.

## 4.3. Procedura testului de imunofluorescență (IF):

- (i) în conformitate cu metoda de preparare a lamelor-test, indicată la pct. 4.1 (i):  
se prepară o serie de diluții de anticorpi la jumătate, într-un tampon IF. Primul godeu trebuie să conțină 1/2 din titru (T/2), celelalte, 1/4 din titru (T/4), 1/2 din titru (T/2), titrul (T) și de două ori titrul (2T);
- (ii) în conformitate cu metoda de preparare a lamelor-test, indicată la pct. 4.1 (ii):  
se prepară diluția de lucru de anticorpi într-un tampon IF. Diluția de lucru are efect asupra specificității.

Figura 1. Prepararea lamei-test în conformitate cu pct. 4.1 (i) și 4.3 (i)

	Diluția de sediment resuspendat					
	1/100	1/1	1/1	1/1	1/1	Diluție de sediment resuspendat
(T = titru)	T/2	T/4	T/2	T	2T	Diluție pe jumătate a antiserului/anticorpilor

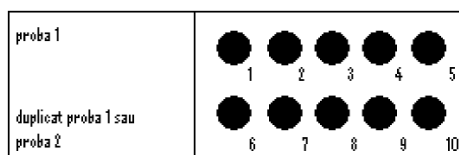
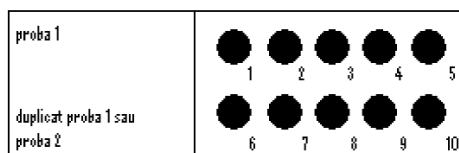


Figura 2. Prepararea lamei de testare în conformitate cu pct 4.1 (ii) și 4.3 (ii)

Diluția de lucru de antiser/anticorp					
1/1	1/10	1/100	gol	gol	Diluție la a zecea parte de sediment resuspendat



4.3.1. Se plasează lamele pe hârtie umedă. Se acoperă complet fiecare godeu cu una sau mai multe diluții de anticorpi. Cantitatea de anticorpi aplicată pe fiecare godeu trebuie să fie cel puțin egală cu volumul de extract aplicat.

În absența instrucțiunilor specifice ale furnizorilor de anticorpi, se aplică următoarea procedură:

4.3.2. Se incubează lamele pe hârtie umedă, acoperite timp de 30 de minute, la temperatura mediului ambiant (18–25°C).

4.3.3. Se elimină picăturile de pe fiecare lamă și se clătește cu grijă cu tampon IF. Se spală prin imersie timp de 5 minute într-o soluție tampon IF-Tween (vezi apendicele 3), apoi încă 5 minute într-o soluție tampon IF. Se evită orice vaporizare sau vărsare care ar putea determina o contaminare încrucișată. Se elimină cu atenție excesul de umiditate cu ajutorul hârtiei sugative.

4.3.4. Se plasează lamele pe hârtie umedă. Se acoperă godeurile cu conjugat FITC la diluția utilizată la titrare. Cantitatea de conjugat aplicată pe godeuri trebuie să fie identică cu cantitatea de anticorpi utilizată.

4.3.5. Se incubează lamele pe hârtie umedă, acoperite timp de 30 de minute, la temperatura mediului ambiant (18–25°C).

4.3.6. Se elimină de pe lamă picăturile de conjugat. Se clătește și se spală în conformitate cu indicațiile anterioare (vezi pct. 4.3.3).

Se elimină cu grijă excesul de umiditate.

4.3.7. În fiecare godeu se pipetează 5–10 µL tampon glicerol-fosfat 0,1 M (vezi apendicele 3) sau un suport antidecolorare din comerț, apoi se acoperă cu o lamelă.

#### 4.4. Citirea testului IF:

4.4.1. Se examinează lamele-test cu ajutorul unui microscop cu epifluorescență prevăzut cu filtre adaptate la excitația FITC-ului, în imersie cu ulei sau apă și cu o mărire de la 500 la 1.000. Se examinează godeurile pe două diametre perpendiculare și în jurul perimetrului. Pentru probele care nu prezintă celule sau care prezintă doar un număr redus de celule se observă cel puțin 40 de câmpuri microscopice.

Se începe prin a se controla lama martorului pozitiv. Celulele trebuie să prezinte o fluorescență vie și să fie complet colorate la titrul de anticorp sau de diluție de lucru determinat. În cazul unei colorări anormale, testul IF (vezi pct. 4) trebuie repetat.

4.4.2. Se caută în godeurile lamelor-test prezența celulelor cu o fluorescență vie și o morfologie caracteristică bacteriei *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (vezi site-ul web <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Intensitatea fluorescenței trebuie să fie echivalentă cu cea a tulpinii martor pozitiv pentru o diluție identică de anticorpi. Celulele a căror colorare este incompletă sau care prezintă o fluorescență slabă nu trebuie luate în considerare.

La cea mai mică suspiciune de contaminare testul trebuie repetat. Acest lucru se poate întâmpla în cazul în care toate lamele dintr-un lot prezintă celule pozitive din cauza contaminării tamponului sau în cazul în care celulele pozitive sunt izolate și găsite în exteriorul godeurilor.

4.4.3. Există un anumit număr de probleme inerente specificității testului de imunofluorescență. La nivelul conurilor de țesut vascular și în segmentele de tulpină de cartof pot apărea populații de celule fluorescente atipice din punct de vedere morfologic, precum și bacterii saprofite care pot da reacții încrucișate având mărime și morfologie asemănătoare cu *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

4.4.4. Numai celulele fluorescente care au o dimensiune și o morfologie caracteristice titrului sau diluției de lucru a anticorpilor menționați la pct. 4.3 trebuie să fie luate în considerare.

#### 4.4.5. Interpretarea testului IF:

- (i) Dacă proba conține celule care prezintă o fluorescență vie și o morfologie caracteristică, se evaluează numărul mediu de celule caracteristice per câmp microscopic și se calculează numărul celulelor menționate per mL de sediment resuspendat (vezi apendicele 4).

Testul IF este considerat pozitiv atunci când proba conține cel puțin  $5 \times 10^3$  celule caracteristice per mL de sediment resuspendat. În acest caz, proba este considerată ca fiind potențial contaminată și trebuie să se continue teste.

- (ii) Testul IF este considerat negativ atunci când proba conține mai puțin de  $5 \times 10^3$  celule per mL de sediment resuspendat, iar proba este considerată necontaminată. Nu este necesară continuarea testelor.

## 5. TESTUL DE HIBRIDIZARE FLUORESCENTĂ IN SITU (FISH)

### Principiu

Dacă testul FISH este folosit ca test de depistare inițial și rezultatul său este pozitiv, trebuie să se efectueze un test IF ca al doilea test obligatoriu de depistare. În cazul în care testul FISH este folosit ca test secundar, iar rezultatul său este pozitiv, diagnosticul trebuie completat de teste suplimentare, așa cum este indicat în diagramă.

#### NOTĂ:

Se utilizează oligosonde validate specifice pentru bacteria *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (vezi apendice 7). Testele preliminare efectuate prin această metodă trebuie să permită detectarea a cel puțin  $10^3$ – $10^4$  celule/mL ale bacteriei *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* adăugate extractelor de probe care au dat anterior rezultate negative.

Este preferabil să se aplice procedura descrisă în continuare pentru extractele de probă proaspăt preparate, dar procedura poate funcționa, de asemenea, utilizând extracte de probă conservate cu glicerol la temperaturi cuprinse între  $-16^\circ\text{C}$  și  $-24^\circ\text{C}$  sau între  $-68^\circ\text{C}$  și  $-86^\circ\text{C}$ .

Ca martori negativi se folosesc extracte de probe care au dus în prealabil la un rezultat negativ, în urma testelor de depistare a bacteriei *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

Ca martori pozitivi se prepară suspensii care conțin între  $10^5$  și  $10^6$  celule/mL de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (de exemplu, tulpini NCPPB 4053 sau PD 406) în tampon fosfat 0,01 M, pornindu-se de la o cultură de trei până la cinci zile (vezi apendicele 2 pentru preparare). Se prepară lame-martor pozitive distincte dintr-o tulpină omologă sau orice altă tulpină de referință a bacteriei *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* într-o suspensie de extract de cartof, așa cum se indică în apendicele 2.

Controlul procesului de hibridizare se realizează prin utilizarea unei oligosonde eubacteriene marcate cu izotiocianat de fluoresceină (FITC), ce colorează toate eubacteriile prezente în probă. Materialul de control se testează la fel ca și probele.

### 5.1. Fixarea extractului de cartof

Protocolul prezentat în cele ce urmează se bazează pe Wullings *et al.* (1998).

5.1.1. Se prepară soluția de fixare (vezi apendicele 7).

5.1.2. Se pipetează 100  $\mu$ L din fiecare extract într-un tub Eppendorf și se centrifughează 8 minute la 7.000 g.

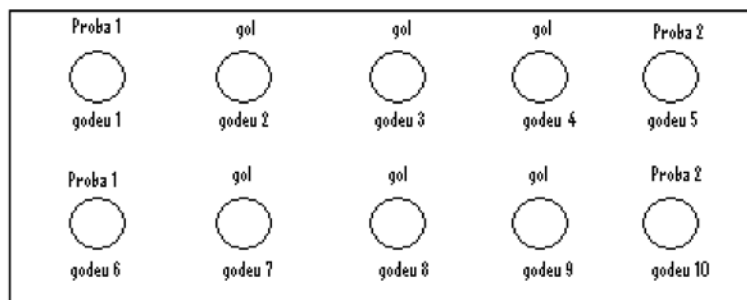
5.1.3. Se elimină supernatantul și se dizolvă sedimentul concentrat în 500  $\mu$ L soluție de fixare preparată cu mai puțin de 24 de ore înainte. Se agită și se lasă la incubat toată noaptea la 4°C.

Se mai poate utiliza pentru fixare etanol 96%. În acest caz, sedimentul menționat la punctul 5.1.2 se dizolvă într-un amestec format din 50  $\mu$ L tampon fosfat 0,01 M și din 50  $\mu$ L etanol 96%. Se vortexează și se incubează timp de 30–60 minute la 4°C.

5.1.4. Se centrifughează timp de 8 minute la 7.000 g, apoi se elimină supernatantul și se resuspendă sedimentul în 75  $\mu$ L tampon fosfat 0,01 M (vezi apendicele 3).

5.1.5. Se pipetează 16  $\mu$ L din fiecare suspensie pe o lamă multitest, așa cum este indicat în figura 3. Pe fiecare lamă se aplică două probe nediluate diferite și din acestea se prelevează 10  $\mu$ L pentru a face o diluție de 1:100 (în tampon fosfat 0,01 M). Restul probei (49  $\mu$ L) poate fi conservat la –20°C, după ce s-a adăugat o cantitate de etanol 96%. În cazul în care este necesară repetarea testului FISH, se elimină etanolul prin centrifugare și se înlocuiește cu o cantitate echivalentă de tampon fosfat 0,01 M (se omogenizează prin agitare).

Figura 3. Dispunerea unei lame pentru testul FISH



5.1.6. Lamele se usucă la aer (sau într-un uscător la 37°C) și se fixează prin flambare.

În acest stadiu procedura poate fi întreruptă, iar hibridizarea poate continua în ziua următoare. Lamele trebuie depozitate la adăpost de praf, într-un loc uscat și la temperatura mediului ambiant.

## 5.2. Prehibridizare și hibridizare

5.2.1. Se prepară o soluție de lizozim din 10 mg lizozim (Sigma L-6876) în 10 mL de tampon (100 mM Tri-HCl, 50 mM EDTA, pH 8,0). Soluția menționată poate fi conservată, dar nu trebuie congelată și dezghețată decât o singură dată. Fiecare probă se acoperă integral cu aproximativ 50  $\mu$ L de soluție de lizozim și se incubează timp de 10 minute la temperatura camerei, apoi lamele se scufundă o singură dată în apă demineralizată și se usucă cu hârtie de filtru.

O altă posibilitate: în fiecare godeu, în locul lizozimului, se adaugă 50  $\mu$ L de 40–400  $\mu$ g/mL proteinază K (preparată în 2mM Tri-HCl, 2mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) și se incubează la 37°C timp de 30 de minute.

5.2.2. Se deshidratează celulele prin băi succesive cu etanol 50%, 80% și 96% câte un minut fiecare. Se plasează lamele pe un suport și se lasă să se usuce în aer liber.

5.2.3. Se prepară o cameră de incubație umedă, tapițând fundul unei cutii ermetice cu hârtie de filtru umedă sau cu hârtie de filtru impregnată cu hibmix 1x (vezi apendicele 7). Se pune la preincubat cutia timp de cel puțin 10 minute în cuptorul de hibridizare, la o temperatură de 55°C.

5.2.4. Se prepară soluția de hibridizare (vezi apendicele 7), putându-se folosi până la 45  $\mu$ L pe lamă, apoi se preincubează timp de 5 minute la o temperatură de 55°C.

5.2.5. Se plasează lamele pe o placă încălzită la 45°C și se pipetează 10  $\mu$ L soluție de hibridizare în fiecare dintre cele patru godeuri ale fiecărei lame.

5.2.6. Se acoperă fiecare lamă cu două lamele (24 x 24 mm), avându-se grijă să nu prindă aer. Apoi se plasează lamele în camera de hibridizare umedă preîncălzită și se lasă acolo o noapte, la întuneric, la o temperatură de 55°C, pentru a permite desfășurarea hibridizării.

5.2.7. Se prepară trei recipiente de laborator care conțin 1 L apă ultrapură, 1 L hibmix 1x (334 mL hibmix 3x în 666 mL apă ultrapură) și 1 L hibmix 1/2x (167 mL hibmix 3x în 833 mL apă ultrapură). Fiecare dintre recipiente se preincubează în baie de apă, la o temperatură de 55°C.

5.2.8. Se îndepărtează lamelele de pe lame și se plasează lamele pe un suport.

5.2.9. Se elimină excesul de sondă prin incubare la 55°C timp de 15 minute în recipientul de laborator care conține hibmixul 1x.

5.2.10. Se transferă suportul cu lame într-o soluție de spălat ce conține hibmix 1/2 și se incubează timp de încă 15 minute.

5.2.11. Se scufundă rapid lamele într-o baie de apă ultrapură și se usucă cu hârtie de filtru. Se elimină excesul de umiditate, așezând ușor hârtia de filtru peste suprafața care trebuie uscată. Se pipetează în fiecare godeu între 5 și 10  $\mu$ L de soluție suport antidecolorare (de exemplu,

Vectashield de la Vecta Laboratories, CA, USA sau o soluție echivalentă) și se acoperă întreaga suprafață a lamei cu o lamelă mare (24 x 60 mm).

### 5.3. Citirea testului FISH

5.3.1. Lamele se observă imediat cu ajutorul unui microscop cu epifluorescență la o mărire de 630 sau 1.000 x, cu ulei de imersie. Cu un filtru adaptat pentru izotiocianatul de fluoresceină (FITC), celulele eubacteriene (inclusiv majoritatea celulelor gram-negative) prezente în probă se colorează în verde fluorescent. Cu un filtru adaptat pentru tetrametilrodamină-5-izotiocianat, celulele de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, marcate cu Cy3, apar colorate în roșu fluorescent. Se compară morfologia celulelor cu cea a martorilor pozitivi. Celulele trebuie să fie complet colorate și să prezinte o fluorescență vie. În caz de colorare anormală, testul FISH (vezi pct. 9.4) trebuie repetat. Se examinează godeurile pe două diametre perpendiculare și în jurul perimetrului. Pentru probele care nu prezintă celule sau care prezintă doar un număr redus de celule se observă cel puțin 40 de câmpuri microscopice.

5.3.2. Se caută în godeurile lamelor-test prezența celulelor care prezintă o fluorescență vie și o morfologie caracteristică bacteriei *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (vezi site-ul web <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Intensitatea fluorescenței trebuie să fie echivalentă cu cea a tulpinilor-martor pozitiv sau superioară acesteia. Celulele a căror colorare este incompletă sau care prezintă o fluorescență slabă nu trebuie luate în considerare.

5.3.3. La cea mai mică suspiciune de contaminare, testul trebuie repetat. Acest lucru se poate întâmpla în cazul în care toate lamele dintr-un lot prezintă celule pozitive din cauza contaminării tamponului sau în cazul în care celulele pozitive sunt găsite în afara godeurilor.

5.3.4. Există un anumit număr de probleme inerente specificității testului FISH. La nivelul conurilor de țesut vascular și în segmentele de tulpini de cartof pot apărea populații de celule fluorescente atipice din punct de vedere morfologic, precum și bacterii saprofite care pot da reacții încrucișate, având mărimea și morfologia asemănătoare cu *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Fenomenul menționat este cu toate acestea mult mai puțin frecvent decât în cazul testului IF.

5.3.5. Doar celulele fluorescente care prezintă mărime și morfologie caracteristice trebuie luate în considerare (vezi pct. 5.3.2).

### 5.3.6. Interpretarea rezultatului testului FISH:

- (i) rezultatele testului FISH sunt valabile atunci când prin intermediul filtrului pentru FITC se observă celule care prezintă o fluorescență vie de culoare verde și o mărime și o morfologie caracteristice bacteriei *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Cu ajutorul filtrului pentru rodamină se observă celule care prezintă o fluorescență vie de culoare roșie la toți martorii pozitivi și la niciun martor negativ. Dacă proba conține celule care prezintă o fluorescență vie și o morfologie caracteristică, se determină numărul mediu de celule caracteristice pe câmp microscopic și se calculează numărul celulelor respective per mL de sediment resuspendat (vezi apendicele 4). Probele care conțin cel puțin  $5 \times 10^3$  celule caracteristice per mL de sediment resuspendat sunt considerate ca fiind potențial contaminate. În această situație se vor continua testele. Probele care conțin mai puțin de  $5 \times 10^3$  celule caracteristice per mL de sediment resuspendat sunt considerate ca fiind negative;
- (ii) testul FISH este negativ în cazul în care nu se observă, cu ajutorul filtrului pentru rodamină, celule de mărimea și cu morfologia caracteristice bacteriei *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, care prezintă o fluorescență vie de culoare roșie. Astfel de celule caracteristice cu o fluorescență vie și de culoare roșie trebuie să fie observate cu filtrul pentru rodamină numai în preparatele de martori pozitivi.

## 6. TESTUL REACȚIEI DE POLIMERIZARE ÎN LANȚ (PCR)

### Principii

Dacă testul PCR este folosit ca test principal de depistare și rezultatul său este pozitiv, trebuie să se efectueze un test IF ca test secundar de depistare obligatoriu. În cazul în care testul PCR este folosit ca test secundar, iar rezultatul său este pozitiv, diagnosticul trebuie completat de teste suplimentare, așa cum este indicat în diagramă.

Exploatarea completă a metodei menționate ca test de depistare principal nu se recomandă decât în cazul în care există o expertiză specializată în domeniu.

### NOTĂ:

Testele preliminare efectuate în conformitate cu această metodă trebuie să permită detectarea a  $10^3$ – $10^4$  celule/mL de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, care se adăugă extractelor de probe care au dat anterior rezultate negative. Se pot dovedi necesare experiențe de optimizare pentru a obține niveluri maxime de sensibilitate și de specificitate în toate laboratoarele.

Se folosesc reactivi și protocoale PCR validate. Se alege, de preferință, o metodă cu control intern.

Se iau precauțiile necesare pentru a se evita contaminarea probei cu ADN-ul țintă. Pentru a reduce pe cât posibil riscul contaminării cu ADN-ul țintă, ar trebui ca testul PCR să fie efectuat de către tehnicienii experimentați, în laboratoare de biologie moleculară specializate.

Martorii negativi (în ceea ce privește procedurile PCR și de extracție a ADN-ului) trebuie tratați întotdeauna ca probe finale în procedură, pentru a evidenția apariția unui eventual transfer de ADN.

În testul PCR trebuie incluși următorii martori negativi:

— extract de probă care a dat anterior rezultate negative pentru bacteria *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*;

— tamponare-martori folosite pentru extracția bacteriei și a ADN-ului din probă;

— mixul pentru PCR.

De asemenea, trebuie incluși aici și următorii martori pozitivi:

— alicoji din sedimente resuspendate, după ce s-a adăugat bacteria *C. m.* ssp. *sepedonicus* (vezi apendicele 2 pentru preparare);

— suspensie în mediu apos de  $10^6$  celule per mL dintr-un izolat virulent al bacteriei *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (de exemplu, NCPPB 2140 sau NCPPB 4053);

— de asemenea, în cazul în care este posibil, pentru testul PCR se utilizează ADN extras din probe de martori pozitivi.

*Pentru a evita riscurile de contaminare, martorii pozitivi se prepară într-un mediu diferit de cel în care se găsesc probele care trebuie testate.*

În măsura posibilului, extractele de probe trebuie curățate de pământ. În anumite cazuri este recomandabil să se prepare extracte din cartofi spălați, dacă se prevede folosirea protocoalelor PCR.

#### 6.1. Metode de purificare a ADN-ului

Se folosesc probe-martori pozitivi și negativi, conform metodei descrise anterior.

Materialul de control se prepară la fel ca și probele.

Există o serie întreagă de metode pentru purificarea ADN-ului-țintă, în cazul substratelor de probe complexe, pentru a elimina inhibitorii PCR și alte reacții enzimaticice și pentru a concentra ADN-ul-țintă în extractul de probă.

Următoarea metodă a fost optimizată pentru a fi utilizată cu metoda PCR validată, descrisă în apendicele 6.

##### 6.1. a) Metoda Pastrik (2000)

1. Se pipetează 220  $\mu$ L tampon de liză (100 mM NaCl, 10mM Tri-HCl  $\text{pH}$  8,0 $\phi$ , 1 mM EDTA  $\text{pH}$  8,0 $\phi$ ) într-un tub Eppendorf de 1,5 mL.

2. Se adaugă 100  $\mu$ L de extract de probă și se așază într-un bloc de încălzire sau într-o baie de apă la temperatura de 95°C timp de 10 minute.

3. Se așază tubul pe gheață timp de 5 minute.

4. Se adaugă 80  $\mu$ L soluție concentrată de lizozim (50 mg de lizozim/mL în 10 mM Tri HCl,  $\text{pH}$  8,0) și se incubează la temperatura de 37°C timp de 30 de minute.

5. Se adaugă 220  $\mu$ L Easy DNA<sup>®</sup> soluție A (Invitrogen), se omogenizează bine prin vortexare și se incubează la temperatura de 65°C timp de 30 de minute.

6. Se adaugă 100  $\mu$ L Easy DNA<sup>®</sup> soluție B (Invitrogen), se omogenizează bine prin vortexare până când precipitatul circulă liber în tub, iar proba prezintă o viscozitate uniformă.

7. Se adaugă 500  $\mu$ L cloroform și se omogenizează prin vortexare până când viscozitatea scade, iar amestecul devine omogen.

8. Se centrifughează la 15.000 g timp de 20 de minute, la temperatura de 4°C, pentru a separa fazele și a forma interfaza.

9. Se transfera faza superioară într-un alt tub Eppendorf.

10. Se adaugă 1 mL etanol 100% (-20°C), se omogenizează rapid prin vortexare și se incubează pe gheață timp de 10 minute.

11. Se centrifughează la 15.000 g timp de 20 de minute la temperatura de 4°C, apoi se elimină etanolul din sediment.

12. Se adaugă 500  $\mu$ L etanol 80% (-20°C) și se amestecă răsturnând tubul.

13. Se centrifughează la 15.000 g timp de 10 minute la temperatura de 4°C, se conservă sedimentul și se elimină etanolul.

14. Se lasă să se usuce extractul în aer liber sau într-un Speed Vac de ADN.

15. Se resuspendă sedimentul în 100  $\mu$ L apă ultrapură sterilă și se lasă la temperatura camerei timp de cel puțin 20 de minute.

16. Se conservă la temperatura de -20°C până când se va utiliza pentru PCR.

17. Se izolează orice precipitat alb prin centrifugare și se utilizează 5  $\mu$ L din supernatantul ce conține ADN-ul pentru PCR.

6.1. b) Alte metode

Se pot aplica și alte metode de extracție a ADN-ului (de exemplu, Qiagen DNeasy Plant Kit), cu condiția ca metodele respective să aibă o eficacitate recunoscută ca fiind echivalentă, pentru purificarea ADN-ului provenit din probele-martori care conțin între  $10^3$  și  $10^4$  celule de agent patogen per mL.

6.2. PCR

6.2.1. Se prepară probele-test și controalele pentru PCR, urmând protocoale validate (vezi apendicele 6). Se prepară o diluție zecimală din extractul de ADN provenit din probă (1:10 în apă ultrapură).

6.2.2. Se prepară mix-ul pentru PCR într-un mediu lipsit de orice contaminare, în conformitate cu protocoalele publicate (vezi apendicele 6). Protocolul PCR validat este o reacție multiplex care include și un control PCR intern.

6.2.3. Se adaugă 5  $\mu$ L de extract de ADN la 25  $\mu$ L reactiv PCR în tuburi PCR sterile.

6.2.4. Se constituie o probă-martor negativ, care nu conține decât mix-ul pentru PCR, și se adaugă în locul probei apă ultrapură provenind din aceeași sursă ca și cea utilizată în amestecul PCR.

6.2.5. Se așază tuburile în același termociclor folosit la testul preliminar și se lansează programul PCR optimizat în mod corespunzător (vezi apendicele 6).

6.3. Analiza produsului reacției PCR

6.3.1. Se vizualizează ampliconii prin electroforeză în gel de agaroză. O cantitate de cel puțin 12  $\mu$ L de ADN amplificat, provenit de la fiecare probă, la care se adaugă 3  $\mu$ L de tampon de încărcare (vezi apendicele 6), se supune unei tensiuni de 5–8 V/cm în geluri de agaroză 2,0% într-un tampon tris-acetat EDTA (TAE) (vezi apendicele 6). Se utilizează un marker de ADN corespunzător, de exemplu „100 bp ladder“.

6.3.2. Pentru a pune în evidență benzile de ADN se folosește colorarea cu bromură de etidiu (0,5 mg/L) timp de 30–45 de minute, luând *precauțiile care se impun pentru manipularea agentului mutagen în cauză*.

6.3.3. În cazul produselor PCR care au mărimea corespunzătoare (vezi apendicele 6), se vizualizează gelul colorat la transiluminator sub unde UV scurte (de exemplu,  $\lambda = 302$  nm) și se notează rezultatele.

6.3.4. Pentru toate cazurile/rezultatele noi se verifică autenticitatea ampliconului, efectuându-se o analiză de restricție enzimatică pe o probă din ADN-ul amplificat rămas. În acest scop, se lasă la incubat la o temperatură optimă și pe o durată optimă, folosindu-se o enzimă și un tampon corespunzătoare (vezi apendicele 6). Se vizualizează fragmentele restrictate prin electroforeză în gel de agaroză, în conformitate cu metoda indicată anterior, și se vizualizează la transiluminator sub UV dispunerea caracteristică a fragmentelor după restricția enzimatică și colorarea cu bromură de etidiu. Se compară apoi cu martorii pozitivi dinainte și de după restricție.

Interpretarea rezultatului testului PCR:

— testul PCR este negativ dacă se observă în mod evident ampliconul PCR specific bacteriei *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* de mărimea corespunzătoare, numai în martorii pozitivi, dar nu și în proba de analizat (în cazul unui PCR multiplex cu primeri de control intern specifici plantei, un al doilea produs PCR de mărimea corespunzătoare trebuie amplificat cu proba în cauză);

— testul PCR este pozitiv dacă se observă în mod evident ampliconul PCR specific bacteriei *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* de mărimea și (în cazul în care este necesar) dispunerea postrestricție preconizate, cu condiția să nu fie amplificat cu una dintre probele-martori negativi. De asemenea, un rezultat pozitiv se poate confirma prin repetarea testului cu o a doua serie de primeri PCR (vezi pct. 9.3).

NOTĂ:

Se poate suspecta o inhibiție a PCR-ului, în cazul în care ampliconul corespunzător se obține în martorul pozitiv care conține bacteria *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* în soluție apoasă, iar martorii pozitivi care conțin *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* în extractul de cartof dau un rezultat negativ. În protocoalele de multiplex PCR cu controale PCR interne inhibiția reacției este probabilă atunci când nu se obține niciunul dintre cei 2 ampliconi.

Se poate suspecta o contaminare dacă ampliconul corespunzător este evidențiat în cel puțin unul dintre martorii negativi.

## 7. TESTUL BIOLOGIC

### NOTĂ:

Testele preliminare realizate în conformitate cu această metodă trebuie să permită detectarea de  $10^3$ – $10^4$  celule formatoare de colonii de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* /mL, adăugate extractelor de probe care anterior au dat rezultate negative (pentru preparare vezi apendicele 2).

Pentru a obține o sensibilitate maximă a detecției este preferabil să se utilizeze un extract de probă proaspăt preparat în condiții optime de creștere. Cu toate acestea, metoda poate fi aplicată cu succes pentru extracte conservate cu glicerol la temperaturi cuprinse între  $-68^{\circ}\text{C}$  și  $-86^{\circ}\text{C}$ .

Anumite soiuri de vinete constituie un mediu selectiv excelent de îmbogățire pentru creșterea bacteriei *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* chiar și în absența simptomelor și permit, de asemenea, realizarea unui excelent test de confirmare.

Pentru a reduce riscul de a obține rezultate fals negative, condițiile de creștere trebuie să fie optime.

Pentru detaliile privind cultura vezi apendicele 8.

7.1. Se repartizează pe vinete, în conformitate cu una dintre metodele indicate în continuare (vezi pct. 7.3 sau 7.4), tot alicotul rămas din sedimentul resuspendat, obținut conform prevederilor pct. 3.1.6 sau 3.2.5. Se folosesc doar plante ajunse în stadiul celei de-a doua sau a treia frunze, până la dezvoltarea completă a celei de-a treia frunze adevărate. Pentru a folosi integral sedimentul resuspendat și pentru a asigura eficacitatea inoculării, pentru procedurile descrise în continuare sunt necesare între 15 și 25 vinete per probă.

7.2. Înainte de inoculare, vinetele nu trebuie udate timp de una sau două zile, pentru a reduce turgescența.

### 7.3. Inoculare prin incizie

7.3.1. Se ține planta între două degete și se pipetează pe tulpină, între cotiledoane și prima frunză, o picătură (în jur de 5–10  $\mu\text{L}$ ) de sediment resuspendat.

7.3.2. Cu ajutorul unui bisturiu steril se realizează, plecând de la picătura de sediment, o incizie diagonală cu o lungime de 1,0 cm și o adâncime aproximativ egală cu două treimi din grosimea tulpinii.

7.3.3. Se închide incizia cu vaselină sterilă, folosindu-se o seringă.

### 7.4. Inoculare prin injecție

Se injectează sediment resuspendat în tulpini de vinete chiar deasupra cotiledoanelor, cu ajutorul unei seringi dotate cu un ac hipodermic (nu mai puțin de 23 G), repartizându-se în toate plantele de vinete utilizate pentru testare.

7.5. Ca martori pozitivi se inoculează 5 plante prin aceeași metodă (vezi pct. 7.3 sau 7.4), cu o suspensie apoasă care conține între  $10^5$  și  $10^6$  celule/mL dintr-o cultură cunoscută de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, și, în cazul în care este posibil, cu extract din tubercul infectat în mod natural (vezi pct. 4).

7.6. Ca martori negativi se inoculează 5 plante prin aceeași metodă (vezi pct. 7.3 sau 7.4), cu o soluție tampon fosfat sterilă.

7.7. Se lasă plantele la incubat până la 4 săptămâni la temperaturi cuprinse între  $18^{\circ}\text{C}$  și  $24^{\circ}\text{C}$ , în condiții de carantină. În timpul incubației se menține o lumină suficientă și un grad ridicat de umiditate (de la 70% la 80%), asigurându-se o udare adecvată pentru a evita orice obturare hidrică sau veștejire din cauza lipsei apei. Celulele de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* nu rezistă la temperaturi mai mari de  $30^{\circ}\text{C}$ ; temperatura optimă de dezvoltare este de  $21^{\circ}\text{C}$ . Pentru a evita riscurile de contaminare, martorii pozitivi și negativi se pun la incubat în seră sau fitotron pe etajere complet separate sau, în cazul în care spațiul este limitat, se prevede o compartimentare riguroasă. În cazul în care plantele infectate provenite din probe diferite trebuie să stea la incubat aproape unele de altele, plantele respective se vor separa cu ajutorul unor ecrane corespunzătoare. Se va acorda o mare atenție evitării contaminării încrucișate în timpul fertilizării, al udării, al inspecțiilor și în orice alt caz de manipulare. Este necesar să se evite prezența insectelor în sere sau fitotroane, deoarece sunt susceptibile de a răspândi bacteria de la o proba la alta.



7.8. După o săptămână se examinează cu regularitate plantele pentru a identifica apariția simptomelor. Se numără plantele care prezintă simptome. *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* provoacă la vinete o veștejire a frunzelor, care se poate manifesta în primul rând printr-o înmuiere a marginilor frunzelor sau între nervuri. La început, țesutul veștejit poate lua o culoare verde închis sau un aspect pestriț, dar pălește înainte de a se necroza. Veștejirile dintre nervuri prezintă adesea aspectul unsuros al țesuturilor saturate cu apă. Țesutul necrozat prezintă adesea o margine de culoare galben viu. Plantele nu mor neapărat. Cu cât simptomele întârzie să apară, cu atât șansele de supraviețuire sunt mai mari. Plantele pot învinge infecția. Plantele tinere sunt mult mai sensibile la populațiile slabe de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* decât plantele mai în vârstă, de unde necesitatea de a utiliza plante în stadiul celei de-a treia frunze adevărate sau chiar înaintea acestui stadiu.

Veștejirile mai pot fi provocate și de populații de alte bacterii sau de ciuperci prezente în extract. Este vorba, printre altele, de *Ralstonia solanacearum*, de *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* și de *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*, de *Erwinia chrysanthemi*, de *Phoma exigua* var. *foveata*, precum și de vaste populații de bacterii saprofite. *Erwinia chrysanthemi*, în special, poate induce simptome la nivelul frunzelor și o veștejire foarte asemănătoare cu simptomele produse de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, cu singura diferență că infecțiile cu *Erwinia chrysanthemi* provoacă o înnegrire a tulpinilor. Alte tipuri de veștejiri se disting de cele provocate de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* prin faptul că frunzele sau plantele întregi se ofilesc rapid. De asemenea, se poate recurge la o colorare Gram pentru a distinge bacteria *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* de bacteria *Erwinia* spp.

7.9. Odată cu apariția simptomelor pe vinete trebuie să se efectueze noi operațiuni de izolare, utilizându-se segmente de țesut care provin din frunzele veștejite sau din tulpinile plantelor (pentru macerarea țesuturilor vezi pct. 3.1.3). Se dezinfectează suprafața frunzelor și a tulpinilor de vinete cu etanol 70%. Se efectuează un test IF sau PCR pe extractul de vinete și se trece la izolarea pe mediu adecvat (selectiv) (vezi pct. 8). De asemenea, este posibil să se efectueze o colorare Gram (vezi apendicele 9). Se identifică culturile pure ale izolatelor presupuse a fi de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* și li se confirmă patogenitatea (vezi pct. 9 și 10).

7.10. În anumite circumstanțe și, în special, în cazul în care condițiile de cultură nu sunt optime, *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* poate fi prezent în vinete într-un stadiu de infecție latentă, chiar și după perioade de incubație care ajung până la 4 săptămâni. În cazul în care după 4 săptămâni nu se observă niciun simptom, se efectuează un test IF sau PCR pe o probă mixtă de segmente de tulpini de 1 cm provenind de la fiecare plantă-test, prelevate de deasupra punctului de inoculare. În cazul în care testul este pozitiv, se efectuează o nouă izolare pe un mediu adecvat (selectiv), conform procedurii de la pct. 8. Se identifică culturile pure ale izolatelor presupuse a fi de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* și li se confirmă patogenitatea (vezi pct. 9 și 10).

Interpretarea rezultatelor testului biologic

Rezultatele testului biologic sunt valabile atunci când plantele care constituie martorul pozitiv prezintă simptome caracteristice, bacteria poate fi reizolată din aceste plante și când nu se observă niciun simptom pe martorii negativi.

Testul biologic este negativ în cazul în care plantele-test nu sunt infectate cu bacteria *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, aceasta fiind evidențiată numai pe martorii pozitivi.

Testul biologic este pozitiv în cazul în care plantele-test sunt infectate cu bacteria *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

## 8. IZOLAREA BACTERIEI *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SSP. *SEPEDONICUS*

NOTĂ:

Diagnosticul nu poate fi confirmat decât după izolarea și identificarea bacteriei *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (vezi pct. 9), urmate de o confirmare prin testul de patogenitate (vezi pct. 10). Deși este vorba de un organism dificil de izolat, el poate fi totuși izolat din țesut simptomatic.

Cu toate acestea, organismul poate fi inhibat de bacterii saprofite cu creștere rapidă, ceea ce îl face dificil de izolat în mod direct din sedimentul de țesut de tubercul sau de tulpină (vezi pct. 3.1.6 sau 3.2.5). Izolarea directă a bacteriei *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* se poate realiza pe mediu selectiv, pornindu-se de la diluții corespunzătoare ale sedimentului resuspendat provenit din conuri sau tulpini de cartof.

Izolările trebuie să se realizeze pornindu-se de la toți tuberculii sau fragmentele de tulpini de cartof cu simptome și de la toate vinetele care nu prezintă simptome, dar la care testul IF sau PCR efectuat pe o probă mixtă (vezi pct. 7.10) a fost pozitiv. Dacă este cazul, tulpinile de vinete trebuie să fie macerate conform metodei descrise la pct. 3.1.3.

Ca martori pozitivi se prepară diluții zecimale dintr-o suspensie de  $10^6$  ufc/mL de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (de exemplu, NCPPB 4053 sau PD 406). Pentru a se evita orice posibilitate de contaminare, martorii pozitivi se vor prepara separat de probe.

În cazul fiecărui lot de mediu selectiv nou-preparat, trebuie să se verifice în ce măsură acesta este potrivit pentru cultura agentului patogen înainte de a-l utiliza pentru testarea de rutină a probelor.

Materialul de control se testează la fel ca și probele.

### 8.1. Izolarea pe medii selective

8.1.1. Pornindu-se de la 100  $\mu$ L alicot obținut dintr-un sediment de cartof resuspendat sau din extract de vinete, se efectuează diluții la a zecea parte într-un tampon de sedimentare 10mM (vezi apendicele 3).

8.1.2. Tentativele de izolare pornindu-se de la sediment nediluat de cartof se soldează, în general, cu eșecuri datorită dificultăților care apar la izolarea bacteriei *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* și a concurenței saprofitilor. Deoarece bacteria este în general prezentă în număr mare de populații în țesuturile infectate, adesea saprofiții pot fi înlăturați prin diluție, dar păstrându-se totodată agentul patogen. Prin urmare, se recomandă să se utilizeze tehnica de însămânțare pe plăci cu ajutorul unei anse, însămânțându-se câte 100  $\mu$ l din fiecare probă și din fiecare diluție de 1/100 până la 1/10.000 pe mediu MTNA sau NCP-88 (vezi apendicele 5).

#### NOTĂ:

O altă modalitate poate consta în însămânțarea, cu ajutorul unei anse, a 100  $\mu$ L din alicotul sedimentului de cartof inițial, la început pe o placă cu agar, apoi de pe aceasta pe o a doua placă cu agar, însămânțându-se astfel în striuri pe cea de-a doua placă ceea ce a rămas pe ansă; în final, procedura se repetă pe o a treia placă, ansa permițând astfel ca pe plăci să se obțină un efect de diluție.

8.1.3. Se incubează plăcile la întuneric, la temperaturi cuprinse între 21°C și 23°C.

8.1.4. Prima examinare a plăcilor, prin comparație cu plăcile-martor, cu numărarea eventualelor colonii asemănătoare cu cele produse de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, trebuie să se realizeze după 3 zile. Numărarea ulterioară se va realiza după 5, 7 și, în final, 10 zile.

### 8.2. Purificarea coloniilor suspecte

#### NOTĂ:

Trebuie să se efectueze o repicare pe mediu YGM a coloniilor asemănătoare cu cele produse de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, în scopul inoculării ulterioare a vinetelor și/sau al identificării. Aceasta trebuie efectuată înainte ca plăcile să atingă o creștere excesivă, de preferință, după 3—5 zile.

8.2.1. Se efectuează o însămânțare în striuri a coloniilor asemănătoare cu cele produse de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* pe unul dintre următoarele medii (rețetele figurează în apendicele 5):

- nutrient dextroza agar (numai pentru repicări);
- drojdie peptonă glucoză agar;
- extract de drojdie săruri minerale agar.

Se incubează 10 zile la o temperatură cuprinsă între 21°C și 24°C.

*Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* crește lent, producând, în general, în 10 zile colonii de dimensiunea și de forma unui vârful de ac, sub formă de cupolă și de culoare crem. Fotografii ale coloniilor caracteristice bacteriei *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* sunt prezentate la adresa <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

8.2.2. Se însămânțează din nou în striuri pentru a obține culturi pure.

Ratele de creștere sunt îmbunătățite prin subculturi. Coloniile caracteristice sunt de culoare crem-albicioasă sau de culoarea fildeșului, uneori galbene, rotunjite, netede, înălțate sub formă de cupolă convexă, cu o consistență mucoid-fluidă, cu margini întregi, cu diametrul în general de 1—3 mm.

O simplă colorare Gram (vezi apendicele 9) poate ajuta la selectarea coloniilor în vederea efectuării testelor suplimentare.

8.2.3. Se identifică culturile presupuse (vezi pct. 9) și se realizează un test de patogenitate (vezi pct. 10).

#### 9. IDENTIFICARE

Se identifică culturile pure obținute din izolatele presupuse a fi *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, utilizându-se cel puțin două dintre testele prezentate în continuare, bazate pe principii biologice diferite.

Dacă este cazul, pentru fiecare test efectuat se includ tulpini de referință cunoscute.

##### 9.1. Teste de identificare de nutriție și enzimatică

Se determină caracteristicile fenotipice menționate în continuare, care sunt în mod sistematic prezente sau absente la *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, în conformitate cu metodele lui Lelliott și Stead (1987), Klement *et al.* (1990), Schaad (2001) și anonim (1987).

Toate mediile se incubează la temperatura de 21°C și se examinează după 6 zile. În cazul în care nu se constată nicio creștere, se incubează până la 20 de zile.

Fiecare test trebuie să includă o tulpină cunoscută de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* ca martor. Testele de nutriție și cele fiziologice trebuie să fie efectuate utilizându-se un inocul provenit din repicări pe agar nutritiv. Comparațiile morfologice trebuie să se efectueze pe culturi obținute pe nutrient dextroza agar.

<u>Teste</u>	<u>Rezultate preconizate</u>
Oxidare/fermentare (O/F)	Inert sau slab oxidant
Oxidază	—
Creștere la 37°C	—
Activitatea ureazei	—
Hidroliza esculinei	+
Hidroliza amidonului	— sau slab
Creștere în soluție de NaCl 7%	—
Producția de indol	—
Activitatea catalazei	+
Producție de H <sub>2</sub> S	—
Utilizarea citratului	—
Lichefierea gelatinei	—
Producția de acid din glicerol	—
Producția de acid din lactoză	— sau slab
Producția de acid din ramnoză	—
Producția de acid din salicin	—
Colorația Gram (vezi apendice 9)	+

##### 9.2. Testul de imunofluorescență (IF)

a) Se prepară o suspensie de aproximativ 10<sup>6</sup> celule per mL într-un tampon IF (vezi apendicele 3).

b) Se prepară o diluție la jumătate dintr-un antiser corespunzător.

c) Se urmează procedura testului IF (vezi pct. 4).

d) Pentru ca un test IF să fie pozitiv, titrul obținut din cultură trebuie să fie echivalent cu cel obținut din martorul pozitiv.

##### 9.3. Testul reacției de polimerizare în lanț (PCR)

a) Se prepară o suspensie de aproximativ 10<sup>6</sup> celule per mL în apă ultrapură.

b) Într-un bloc de încălzire sau într-o baie de apă fiartă se încălzesc 100 μl de suspensie în tuburi închise, la temperatura de 100°C timp de 4 minute. Dacă este necesar, se adaugă NaOH proaspăt preparat, cu o concentrație finală de 0,05 M pentru a facilita liza celulelor. Probele pot fi depozitate la temperaturi cuprinse între -16°C și -24°C, până în momentul utilizării.

c) Se aplică procedurile PCR corespunzătoare pentru a amplifica ampliconii specifici de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (de exemplu: Pastrik, 2000; vezi apendicele 4; Li și de Boer, 1995; Mills *et al.*, 1997; Pastrik și Rainey, 1999; Schaad *et al.*, 1999).

(d) Identificarea bacteriei *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* este pozitivă atunci când ampliconii PCR au aceeași dimensiune și prezintă aceleași polimorfisme de lungime ale fragmentelor de restricție ca și pentru tulpina-martor pozitivă.

#### 9.4. Testul de hibridizare fluorescentă in situ (FISH)

a) Se prepară o suspensie de aproximativ  $10^6$  celule per mL în apă ultrapură.

b) Se urmează procedura testului FISH (vezi pct. 5).

c) Testul FISH este pozitiv în cazul în care se obțin aceleași reacții din cultură ca și la martorul pozitiv.

#### 9.5. Testul de profil al acizilor grași (FAP)

a) Cultura se dezvoltă timp de 72 de ore la temperatura de 21°C (+/-1°C) pe tripticaza soia agar (Oxoid).

b) Se aplică o procedură FAP corespunzătoare (Janse, 1991; Stead, 1992).

c) Pentru ca un test FAP să fie pozitiv, profilul culturii presupuse trebuie să fie identic cu cel al martorului pozitiv. Prezența acizilor grași caracteristici 15:1 Anteiso A, 15:0 Iso, 15:0 Anteiso, 16:0 Iso, 16:0 și 17:0 Anteiso este puternic elocventă pentru bacteria *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Alte genuri de bacterii, ca de exemplu *Curtobacterium*, *Arthrobacter* și *Micrococcus*, prezintă, de asemenea, unii dintre acizii menționați, dar foarte rar 15:1 Anteiso A; în schimb, acidul menționat este prezent la toate bacteriile *Clavibacter* spp., la niveluri cuprinse între 1% și 5%. Pentru *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, nivelul menționat este de obicei în jurul valorii de 5%.

#### 9.6. Testul BOX-PCR

a) Se prepară o suspensie de aproximativ  $10^6$  celule per mL în apă ultrapură.

b) Se efectuează testul conform procedurii (Smith *et al.*, 2001).

### 10. TESTUL DE CONFIRMARE

Testul de patogenitate se efectuează atât pentru a aduce confirmarea finală a unui diagnostic de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, cât și pentru a evalua virulența culturilor identificate ca fiind *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

10.1. Se prepară un inoculum de aproximativ  $10^6$  celule/mL dintr-o cultură de 3 zile a izolatului de testat și dintr-o tulpină-martor pozitivă, corespunzătoare bacteriei *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

10.2. Se inoculează 5–10 tulpini de plante tinere de vinete în stadiul celei de-a treia frunze adevărate (vezi pct. 7.3 sau 7.4).

10.3. Se incubează la temperaturi cuprinse între 18°C și 24°C, la o umiditate relativ ridicată, asigurând o stropire corespunzătoare pentru a preveni obturarea hidrică sau stresul cauzat de secetă (vezi pct. 7.7). În cazul culturilor pure ar trebui să apară o veștejire tipică în două săptămâni; cu toate acestea, plantele care nu prezintă simptome (vezi pct. 7.8) la sfârșitul acestei perioade trebuie lăsate în continuare la incubat până la 3 săptămâni, la temperaturi favorabile creșterii vinetelor, nedepășind temperatura de 25°C (vezi apendicele 8). Dacă la sfârșitul celor 3 săptămâni nu apar simptome, cultura nu poate fi confirmată ca fiind o formă patogenă de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

10.4. Se izolează din plante cu simptome, prelevându-se o secțiune de tulpină la o înălțime de 2 cm deasupra punctului de inoculare. Se mărunțesc și se suspendă într-o cantitate mică de apă distilată sterilă sau de tampon fosfat 50 mM (vezi apendicele 3). Se izolează din suspensie, diluând prin însămânțare simplă sau în striuri pe MTNA și YPGA (vezi apendicele 5), se incubează timp de 3–5 zile la o temperatură cuprinsă între 21°C și 23°C, apoi se observă formarea coloniilor caracteristice de *C. m.* ssp. *sepedonicus*.

### Apendice 1

#### Laboratoare care practică optimizarea și validarea protocoalelor

Laborator <sup>1)</sup>	Localitate	Țară
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Viena și Linz	Austria
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Belgia
Plantetdirektoratet	Lyngby	Danemarca
Central Science Laboratory	York	Anglia

Laborator <sup>1)</sup>	Localitate	Țară
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburgh	Scotia
Laboratoire National de La Protection des Végétaux Unite de Bactériologie	Angers	Franța
Laboratoire National de La Protection des Végétaux Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Franța
Biologische Bundesanstalt Pflanzenschutzamt Hannover	Kleinmachnow Hanover	Germania
State Laboratory Plantenziektenkundige Dienst	Dublin Wageningen	Irlanda Olanda
Norwegian Crop Research Institute, Plant Protection Center	Aas	Norvegia
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lisabona	Portugalia
Nacionalni Institut za Biologijo	Ljubljana	Slovenia
Centro de diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	Spania

<sup>1)</sup> Pentru experții de contact vezi site-ul web la adresa <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

### Apendice 2

#### Prepararea martorilor pozitivi și negativi pentru testele de depistare PCR/IF și FISH aplicate tuberculilor de cartof

Se însămânțează pe un mediu MTNA, timp de 72 de ore, o tulpina virulentă de *C. m. ssp. sepedonicus* ÎNCPB 4053 sau PD 406ș, apoi se suspendă în tampon fosfatat 10 mM, astfel încât să se obțină o densitate celulară de aproximativ  $1-2 \times 10^8$  UFC per mL. Aceasta corespunde, în general, unei suspensii ușor tulburi, care prezintă o densitate optică de 0,20–600 nm.

Se prelevează conurile de la 200 de tuberculi dintr-o recoltă de cartof alb, cunoscută ca fiind lipsită de *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*.

Se tratează conurile urmând metoda obișnuită și se resuspendă sedimentul în 10 mL.

Se pipetează 900  $\mu$ L de sediment resuspendat în 10 microtuburi sterile de 1,5 mL.

Se însămânțează primul microtub cu 100  $\mu$ L din suspensia de *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*. Se omogenizează prin vortexare.

Se stabilesc niveluri de contaminare la a zecea parte, urmând diluții în următoarele 5 microtuburi.

Cele 6 microtuburi contaminate vor fi utilizate ca martori pozitivi. Cele 4 microtuburi necontaminate vor fi utilizate ca martori negativi. Microtuburile se etichetează corespunzător.

Se prepară alicoți de 100  $\mu$ L în microtuburi sterile de 1,5 mL, astfel încât să se obțină 9 repetiții ale fiecărei probe-martor. Se depozitează la temperaturi cuprinse între  $-16$  și  $-24^\circ\text{C}$  până în momentul utilizării.

Prezența și determinarea bacteriei *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* în probele-martor trebuie confirmate în primul rând printr-un test IF.

Pentru testul PCR se extrage ADN pe baza probelor-martor pozitive și negative din fiecare serie de probe.

Pentru testele IF și FISH, se efectuează analize pe probele-martor pozitive și negative ale fiecărei serii de probe.

În cazul testelor IF, FISH și PCR, *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* trebuie detectat în martorii pozitivi cel puțin  $10^6$  și  $10^4$  celule/mL și trebuie să lipsească complet în martorii negativi.

### Apendice 3

#### Tampoane pentru procedurile de testare

Generalitate: tampoanele sterilizate care nu sunt deschise pot fi depozitate timp de maximum un an.

## 1. TAMPOANE PENTRU PROCEDURA DE EXTRAGERE

1.1. **Tampon de extracție (tampon fosfat 50 mM, pH 7,0)**

Tamponul menționat este utilizat pentru extracția, prin omogenizare sau agitare, a bacteriei prezente în țesuturile plantei.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhidru)	4,26 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,72 g
Apă distilată	1,00 L

Se dizolvă ingredientele, se verifică pH-ul și se sterilizează prin autoclavare timp de 15 minute la 121°C.

Următoarele componente pot fi utile:

	Obiect	Cantitate (pe l)
Fulgi de Lubrol	Defloculant*	0,5 g
Antispumant cu DC silicon	Agent antispumant*	1,0 mL
Pirofosfat tetrasodic	Antioxidant	1,0 g
Polivinilpirolidonă -40.000 (PVP-40)	Leagă inhibitorii PCR	50 g

\* A se utiliza cu metoda de extracție prin omogenizare.

1.2. **Tampon de sedimentare (tampon fosfat 10 mM, pH 7,2)**

Tamponul menționat este utilizat pentru resuspendarea și diluția sedimentelor de conuri de cartof concentrate prin centrifugare.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	2,7 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,4 g
Apă distilată	1,00 L

Se dizolvă ingredientele, se verifică pH-ul și se sterilizează prin autoclavare timp de 15 minute la 121°C.

## 2. TAMPOANE PENTRU TESTUL IF

2.1. **Tampon IF (tampon fosfat salin PBS 10 mM, pH 7,2)**

Tamponul menționat este utilizat pentru diluția anticorpilor.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	2,7 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,4 g
NaCl	8,0 g
Apă distilată	1,0 l

Se dizolvă ingredientele, se verifică pH-ul și se sterilizează prin autoclavare timp de 15 minute la 121°C.

2.2. **Tampon IF-Tween**

Tamponul menționat este utilizat pentru spălarea lamelor.

Se adaugă 0,1% Tween 20 la tamponul IF.

2.3. **Tampon Glicerol fosfat, pH 7,6**

Tamponul menționat este utilizat ca lichid de montare pentru lamele IF, pentru a întări fluorescența.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	3,2 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,15 g
Glicerol	50 mL
Apă distilată	100 mL

Soluții suport antidecolorare sunt disponibile în comerț: exemplu, Vectashield® (Vector Laboratories) sau Citifluor® (Leica).

#### **Apendice 4**

##### **Determinarea gradului de contaminare în momentul testelor IF și FISH**

1. Se numără numărul mediu de celule fluorescente caracteristice per câmp (c).
2. Se calculează celulele fluorescente caracteristice per godeu (C).

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

unde:

S = suprafața (S) godeului unei lame cu multe godeuri; și  
s = suprafața câmpului obiectivului

$s = \frac{\pi i^2}{4G^2K^2}$  = unde: i = coeficientul câmpului (depinde de tipul de ocular și variază de la 8 la 24)

K = coeficientul tubului (1 sau 1,25)

G = mărirea obiectivului (de 100 de ori, de 40 de ori etc.)

3. Se calculează celulele fluorescente caracteristice per mL de sediment resuspendat (N)

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

unde: y = volumul de sediment resuspendat din fiecare godeu

F = factorul de diluție al sedimentului resuspendat; și

C = celule fluorescente caracteristice per godeu

#### **Apendice 5**

##### **Medii de izolare și de cultură ale bacteriei *C. m. ssp. sepedonicus***

###### **(a) Medii de cultură generale**

Nutrient agar

Nutrient agar (Difco) 23,0 g

Apă distilată 1,0 L

Se dizolvă ingredientele și se sterilizează prin autoclavare timp de 15 minute la 121°C.

Nutrient dextroza agar (NDA)

Difco Bacto nutrient agar conține 1% D-glucoză (monohidrat). Se sterilizează prin autoclavare la 115°C timp de 20 de minute.

Drojdie peptonă glucoză agar (YPGA)

Extract de drojdie (Difco) 5,0 g

Bacto-peptonă (Difco) 5,0 g

D-glucoză (monohidrat) 10,0 g

Bacto-Agar (Difco) 15,0 g

Apă distilată 1,0 l

Se dizolvă ingredientele și se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 15 minute.

Mediu de extract de drojdie — săruri minerale (YGM)

Extract de drojdie bacto (Difco) 2,0 g

D-glucoză (monohidrat) 2,5 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,25 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,25 g

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,1 g

MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0,015 g

NaCl 0,05 g

FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,005 g

Bacto-Agar (Difco) 18 g

Apă distilată 1,0 L

Se dizolvă ingredientele și se sterilizează, în recipiente de jumătate de litru, prin autoclavare timp de 20 de minute la 115°C.

**(b) Medii de creștere selective validate****Mediu MTNA**

Cu excepția unor mențiuni, toate ingredientele provin de la BDH.

Extract de drojdie (Difco)	2,0 g
Manitol	2,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,25 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,25 g
NaCl	0,05 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1 g
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,015 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,005 g
Agar (oxid nr. 1)	16,0 g
Apă distilată	1,0 L

Se dizolvă ingredientele și se ajustează pH-ul la 7,2. După autoclavare (15 minute la 121°C) și o răcire la 50°C se adaugă antibioticele: trimetoprim 0,06 g, acid nalidixic 0,002 g, amfotericină B 0,01 g.

Soluțiile stoc de antibiotice sunt: trimetoprimul (Sigma) și acidul nalidixic (Sigma) (ambele 5 mg/mL) în metanol 96%; amfotericina B (Sigma) (1 mg/mL) în dimetilsulfoxid. Soluțiile stoc sunt sterilizate prin filtrare.

**NOTĂ:**

Mediul fără antibiotic se conservă timp de 3 luni. După adăugarea antibioticelor mediul se conservă o lună la frigider.

**Mediu NCP-88**

Agar nutritiv (Difco)	23 g
Extract de drojdie (Difco)	2 g
D-manitol	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,25 g
Apă distilată	1,0 L

Se dizolvă ingredientele și se ajustează pH-ul la 7,2. Se sterilizează prin autoclavare și se răcește la 50°C, se adaugă apoi următoarele antibiotice: sulfat de polimixină B (Sigma) 0,003 g, acid nalidixic (Sigma) 0,008 g, cicloheximidă (Sigma) 0,2 g.

Antibioticele se dizolvă în soluțiile stoc, după cum urmează: acidul nalidixic în NaOH 0,01 M; cicloheximida în etanol 50%, sulfatul de polimixină B în apă distilată. Soluțiile stoc sunt sterilizate prin filtrare.

**NOTĂ:**

Mediul fără antibiotic se conservă timp de trei luni. După adăugarea antibioticelor mediul se conservă timp de o lună la frigider.

**Apendice 6****Protocol și reactivi PCR validați****NOTĂ:**

Testele preliminare trebuie să permită detectarea a cel puțin 10<sup>3</sup>–10<sup>4</sup> celule de *C. m. ssp. sepedonicus* per mL de extract de probă.

De asemenea, testele preliminare nu trebuie să indice niciun rezultat fals pozitiv pentru o gamă de tulpini bacteriene selecționate.

**1. PROTOCOL PCR MULTIPLEX CU CONTROL PCR INTERN (PASTRIK, 2000)****1.1. Secvență de oligonucleotide a primerilor**

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

Dimensiunea prevăzută a ampliconului de ADN de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* = 502 bp (în prezența primerului PSA).



Dimensiunea prevăzută a ampliconului controlului PCR intern 18S rRNA = 377 bp (în prezența primerului NS).

### 1.2. Mixul pentru PCR

Reactiv	Cantitate per reacție	Concentrație finală
Apă ultrapură sterilă	15,725 $\mu$ L	
10x tampon PCR <sup>1</sup> (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	2,5 $\mu$ L	1 x (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
BSA (fracție V) (10%)	0,25 $\mu$ L	0,1%
Amestec d-nTP (20 mM)	0,125 $\mu$ L	0,1 mM
Primer PSA-1 (10 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ L	0,2 $\mu$ M
Primer PSA-R (10 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ L	0,2 $\mu$ M
Primer NS-7-F (10 $\mu$ M) <sup>2</sup>	0,1 $\mu$ L	0,04 $\mu$ M
Primer NS-8-R (10 $\mu$ M) <sup>2</sup>	0,1 $\mu$ L	0,04 $\mu$ M
Taq Polimerază (5U/ $\mu$ L) <sup>1</sup>	0,2 $\mu$ L	1,0 U
Volumul probei	5,0 $\mu$ L	
Volum total:	25,0 $\mu$ L	

<sup>1</sup> Metodele au fost validate utilizând Taq polimeraza de la Perkin Elmer (AmpliTaq sau Gold) și Gibco BRL.

<sup>2</sup> Concentrațiile primerilor NS-7-F și NS-8-R au fost optimizate pentru extracția ADN-ului din tuberculii de cartof, utilizând metoda omogenizării și a purificării ADN-ului după Pastrik (2000); vezi pct. 6.1. (a) și 6.2ș. Va fi necesară o nouă optimizare a concentrațiilor de reactivi dacă se utilizează extracția prin agitare sau alte metode de extracție a ADN-ului.

### 1.3. Condiții ale reacției PCR

Se execută următorul program:

- |                   |        |  |
|-------------------|--------|--|
| 1 ciclu de:       | (i)    | 3 minute la 95°C: denaturarea ADN;           |
| 10 cicluri de:    | (ii)   | 1 minut la 95°C: denaturarea ADN;            |
|                   | (iii)  | 1 minut la 64°C: hibridizare cu primerii;    |
|                   | (iv)   | 1 minut la 72°C: elongarea ADN-ului;         |
| 25 de cicluri de: | (v)    | 30 secunde la 95°C: denaturarea ADN;         |
|                   | (vi)   | 30 secunde la 62°C: hibridizare cu primerii; |
|                   | (vii)  | 1 minut la 72°C: elongarea ADN-ului;         |
| 1 ciclu de:       | (viii) | 5 minute la 72°C: elongare finală;           |
|                   | (ix)   | se menține la 4°C.                           |

NOTĂ:

Acest program a fost optimizat pentru termociclorul MJ Research PTC 200. Poate fi necesară modificarea etapelor ciclurilor (ii), (iii), (iv), (v), (vi) și (vii), în cazul utilizării altor modele de termociclor.

### 1.4. Analiza restricției enzimatică a ampliconului

Produsele PCR amplificate ale ADN-ului bacteriei *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* produc un polimorfism distinct al lungimii fragmentelor de restricție cu enzima Bgl II, după incubare la 37°C timp de 30 de minute. Fragmentele de restricție obținute pe baza fragmentului specific de *C. m.* ssp. *sepedonicus* au o lungime de 282 bp și 220 bp.

## 2. PREPARAREA TAMPONULUI DE ÎNCĂRCARE

### 2.1. Albastru de bromfenol (soluție concentrată 10%)

Albastru de bromfenol	5 g
Apă distilată (bidistilată)	50 mL

### 2.2. Tampon de încărcare

Glicerol (86%)	3,5 mL
Albastru de bromfenol (5,1)	300 $\mu$ L
Apă distilată (bidistilată)	6,2 mL

### 3. 10X TAMPON TRISACETAT EDTA (TAE), pH 8,0

Tampon tris	48,4 g
Acid acetic glacial	11,42 mL

EDTA (sare disodică) 3,72 g  
 Apă distilată 1,00 L  
 Înainte de utilizare se diluează până la 1x.  
 Disponibil și în comerț (exemplu Invitrogen sau echivalent).

### Apendice 7

#### Reactivi validați pentru testul FISH

##### 1. Oligosonde

Sonda CMS-CY3-01 specifică pentru Cms 5' — ttg cgg ggc gca cat ctc tgc acg—3'  
 Sonda eubacteriană EUB-338-FITC nespecifică 5' — gct gcc tcc cgt agg agt—3'

##### 2. SOLUȚIE DE FIXARE

*ATENȚIE! SOLUȚIA DE FIXARE CONȚINE PARAFORMALDEHIDĂ, CARE ESTE TOXICĂ. SE MANIPULEAZĂ CU MĂNUȘI ȘI NU SE INHALEAZĂ. SE RECOMANDĂ SĂ SE LUCREZE SUB O NIȘĂ CHIMICĂ.*

- (i) Se încălzesc 9 mL de apă pură moleculară (de exemplu, apă ultrapură) la aproximativ 60°C și se adaugă 0,4 g de paraformaldehidă. Paraformaldehida se dizolvă după ce s-au adăugat 5 picături de 1N NaOH și se amestecă pe un agitator magnetic.
- (ii) Se ajustează pH-ul la 7,0 adăugându-se 1 mL de tampon fosfatat 0,1 M (PB; pH 7,0) și 5 picături de 1N HCl. Se verifică pH-ul cu hârtie indicator și se ajustează, în cazul în care este necesar, cu HCl sau NaOH.

*ATENȚIE! NU SE UTILIZEAZĂ PH-METRU ÎN SOLUȚII CARE CONȚIN PARAFORMALDEHIDĂ.*

- (iii) Soluția se filtrează printr-un filtru cu membrană de 0,22 μm, se protejează de praf și se păstrează la 4°C până la utilizare.

(iv) NOTĂ:

Soluție de fixare alternativă: etanol 96%.

##### 3. HIBMIX 3X

NaCl 2,7 M  
 Tris-HCl 60 mM (pH 7,4)  
 EDTA (sterilizat prin filtrare și autoclavare) 15 mM  
 Se diluează până la 1X, după caz.

##### 4. Soluție de hibridizare

Hibmix 1X  
 Dodecilsulfat de sodiu (SDS) 0,01%  
 Sondă EUB 338 5 ng/μL  
 Sondă CMSCY301 5 ng/μL

Se prepară cantitățile de soluție de hibridizare, respectând calculele din tabel. Pentru fiecare lamă (care conține două probe diferite în duplicat) sunt necesari 90 μL de soluție de hibridizare.

Tabel: Cantități sugerate pentru prepararea amestecului de hibridizare

	2 lame	8 lame
Apă ultrapură sterilă	50,1	200,4
Hibmix 3 x	30,0	120,0
1% Dodecilsulfat de sodiu	0,9	3,6
Sonda EUB 338 (100 ng/μL)	4,5	18,0
Sonda CMSCY301 (100 ng/μL)	4,5	18,0
Volum total (μL)	90,0	360,0

## NOTĂ:

Toate soluțiile care conțin oligosonde sensibile la lumină se depozitează la întuneric și la o temperatură de  $-20^{\circ}\text{C}$ . În timpul utilizării se protejează de lumina directă a soarelui sau de lumina electrică directă.

**5. Tampon fosfat 0,1 M, pH 7,0**

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	8,52 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	5,44 g
Apă distilată	1,00 L

Se dizolvă ingredientele, se verifică pH-ul și se sterilizează prin autoclavare timp de 15 minute la  $121^{\circ}\text{C}$ .

**Apendice 8**

## Culturi de vinete

Se seamănă semințe de vinete (*Solanum melongena*) într-un pământ sterilizat prin pasteurizare. Atunci când cotiledoanele sunt complet dezvoltate (10–14 zile), plantulele se repică într-un pământ sterilizat prin pasteurizare.

Vinetele trebuie cultivate în seră în următoarele condiții:

Durata zilei		14 ore sau durata naturală a zilei
Temperatura:	ziua	$21-24^{\circ}\text{C}$
	noaptea	$15^{\circ}\text{C}$ .
Soiuri sensibile de vinete:		„Black Beauty“; „Long Tom“; „Rima“; „Balsas“.

Furnizor: vezi site-ul web la adresa <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

**Apendice 9**

Procedura pentru reacția Gram (modificarea lui Hucker) (Doetsch, 1981)

*Soluție Cristal violet*

Se dizolvă 2 g cristal violet în 20 mL etanol 95%.

Se dizolvă 0,8 g oxalat de amoniu în 80 mL apă distilată.

Se amestecă cele două soluții.

*Soluția iod Lugol*

Iod	1 g
Iodură de potasiu	2 g
Apă distilată	300 mL

Substanțele solide se zdrobesc împreună cu ajutorul unui pistil și al unui mojar. Se adaugă apă și se amestecă într-un recipient închis pentru a se dizolva.

*Soluție colorantă de safranină*

Soluție stoc:

Safranină O	2,5 g
Etanol 95%	100 mL

Se amestecă și se depozitează.

Se diluează în raport 1:10 pentru a obține o soluție de lucru.

*Procedura de colorare*

1. Se prepară frotiurile, se usucă la aer și se fixează la căldură.
2. Se scufundă lama în soluția de cristal violet timp de un minut.
3. Se spală rapid cu apă currentă.
4. Se scufundă în soluția iod Lugol timp de un minut.
5. Se spală cu apă de robinet și se usucă cu hârtia sugativă.
6. Se decolorează adăugând picătură cu picătură etanol 95%, până când nu își mai modifică culoarea, sau scufundând în etanol timp de 30 de secunde și agitând ușor.

7. Se spală cu apă de robinet și se usucă cu hârtia sugativă.
8. Se scufundă în soluția de safranină timp de 10 secunde.
9. Se spală cu apă de robinet și se usucă cu hârtia sugativă.

Bacteriile Gram pozitive au o culoare violet-albastră; bacteriile Gram negative au o culoare roz-roșie.

*ANEXA Nr.II*

1. Pentru fiecare apariție suspectată pentru care s-a identificat un rezultat pozitiv prin testul/testele de depistare conform metodelor descrise în anexa nr. I și confirmată sau infirmată prin aplicarea completă a metodelor menționate trebuie să se păstreze și să se conserve adecvat:

- toții tuberculii prelevați și, de câte ori este posibil, toate plantele prelevate;
  - orice extract rămas și materialul pregătit suplimentar pentru testul/testele de depistare, de exemplu lamele de imunofluorescență; și
  - toată documentația relevantă,
- până la finalizarea metodei menționate.

Păstrarea tuberculilor permite testarea soiului, efectuată atunci când este cazul.

2. În cazul confirmării organismului, trebuie să se păstreze și să se conserve în condiții corespunzătoare:

- materialul specificat la alin. (1); și
  - o mostră din materialul de vânăta infectată, inoculată cu un tubercul sau extract de plantă; și
  - cultura izolată a organismului,
- timp de minimum o lună de la procedura de notificare conformă art. 5 alin. (2).

*ANEXA Nr.III*

1. Elementele avute în vedere pentru determinarea gradului contaminării probabile conform art. 5 alin. (1) lit. b) includ:

- tuberculii sau plantele cultivate într-un loc de producție declarate ca fiind contaminate conform art. 5 alin. (1) lit. a);
- locul/locurile de producție care au o anumită legătură cu producerea tuberculilor sau plantelor declarate ca fiind contaminate conform art. 5 alin. (1) lit. a), inclusiv acelea care utilizează echipamente și utilaje de producție în mod direct sau printr-un contractor comun;
- tuberculii sau plantele produse în locul/locurile de producție menționat(e) la liniuța anterioară sau prezente în asemenea loc/locuri de producție, în perioada în care tuberculii sau plantele declarate ca fiind contaminate conform art. 5 alin. (1) lit. a) au fost prezente în locurile de producție menționate la prima liniuță;
- locurile unde sunt manipulați cartofii care provin din locurile de producție menționate la liniuțele anterioare;
- orice utilaj, vehicul, container, depozit sau părți din acestea și oricare alte obiecte, inclusiv ambalajul, care au venit în contact cu tuberculii sau plantele declarate ca fiind contaminate conform art. 5 alin. (1) lit. a);
- orice tuberculi sau plante depozitate în sau în contact cu oricare dintre elementele ori obiectele menționate la liniuța anterioară, înainte de curățarea și dezinfectarea acestora;
- acei tuberculi care, ca rezultat al testelor menționate la art. 7, au o legătură clonală cu tuberculii sau plantele declarate ca fiind contaminate conform art. 5 alin. (1) lit. a) și care, deși rezultatele testelor referitoare la prezența organismului au fost negative, sunt considerați probabil contaminați prin intermediul unei legături clonale. Testarea soiului poate fi efectuată pentru a verifica identitatea tuberculilor sau a plantelor contaminate și legătura clonală; și
- locul/locurile de producție a tuberculilor sau a plantelor menționate la liniuța anterioară.

2. Elementele avute în vedere pentru determinarea unei posibile răspândiri conform art. 5 alin. (1) lit. c) includ:

- apropierea de alte locuri de producție unde se cultivă cartofi sau alte plante-gazdă;
- producția și utilizarea comună a stocurilor de cartof de sămânță.

3. Notificarea menționată la art. 5 alin. (2) lit. b) cuprinde:

a) imediat după confirmarea prezenței organismului prin teste de laborator, efectuate conform metodelor descrise în anexa nr. I, cel puțin:

- denumirea soiului lotului de cartofi;
- tipul (consum, sămânță etc.) și, dacă este cazul, categoria de cartofi de sămânță;

b) atunci când există un risc de contaminare a cartofilor proveniți dintr-unul sau mai multe state membre ori care au ca destinație unul sau mai multe state membre, statul membru în care a fost confirmată apariția organismului comunică imediat statului membru sau statelor membre în cauză informațiile necesare conform art. 6, cum ar fi:

- denumirea soiului lotului de cartof;
- numele și adresa expeditorului și destinatarului;
- data livrării lotului de cartof;
- mărimea lotului de cartof livrat;
- atunci când este cazul, o copie a pașaportului fitosanitar sau cel puțin numărul pașaportului fitosanitar, precum și numărul de înregistrare al producătorului sau al comerciantului și o copie a bonului de livrare. Comisiei i se notifică imediat aceste informații;

c) după finalizarea tuturor investigațiilor, pentru fiecare caz:

- data la care s-a confirmat contaminarea;
- o scurtă descriere a investigațiilor realizate pentru identificarea sursei și posibilei răspândiri a contaminării, precizând intensitatea prelevării;
- informații privind sursa/sursele identificate sau presupuse a/ale contaminării;
- detalii ale întinderii contaminării declarate, inclusiv numărul de locuri de producție și numărul de loturi, cu indicarea soiului și, în cazul cartofului de sămânță, a categoriei;
- detalii ale zonei delimitate, inclusiv numărul de locuri de producție nedeclarate ca fiind contaminate, dar incluse în zonă;
- toate celelalte informații pe care Comisia le solicită, referitoare la focarul sau focarele confirmate.

*ANEXA Nr. IV*

1. Măsurile luate sub control oficial, conform art. 8 alin. (1), sunt:

- utilizarea în hrana animalelor după un tratament termic, astfel încât să nu existe niciun risc de supraviețuire a organismului; sau
- eliminarea într-un loc autorizat de distrugere a deșeurilor în mod oficial, în care nu există niciun risc identificabil de propagare a organismului în mediu, de exemplu, prin infiltrare în terenuri agricole; sau
- incinerarea; sau
- transformarea industrială prin livrare directă și imediată la o fabrică de procesare a plantelor care dispune de instalații de eliminare a deșeurilor, autorizate oficial, despre care s-a stabilit că nu prezintă niciun risc identificabil de răspândire a organismului, precum și de un sistem care permite curățarea și dezinfectarea cel puțin a vehiculelor care părăsesc fabrica; sau
- alte măsuri, în situația în care s-a stabilit că nu există niciun risc identificabil de răspândire a organismului; aceste măsuri și justificarea lor trebuie să fie notificate Comisiei și celorlalte state membre.

Toate deșeurile asociate și care rezultă din operațiile menționate anterior sunt eliminate prin metode aprobate oficial, în conformitate cu anexa nr. V la prezentul ordin.

2. Utilizarea sau eliminarea corespunzătoare a tuberculilor ori a plantelor declarate ca fiind probabil contaminate conform art. 5 alin. (1) lit. b) și menționate la art. 8 alin. (2), sub controlul organismelor oficiale responsabile ale statelor membre în cauză, prin comunicări corespunzătoare între organismele oficiale responsabile pentru a asigura controlul permanent și aprobarea de către organismele oficiale responsabile ale statului membru în care cartofii urmează să fie ambalați sau

procesați, cu privire la instalațiile de eliminare a deșeurilor menționate la prima și a doua liniuță, includ:

— utilizarea acestora drept cartofi destinați consumului, în ambalaje prevăzute pentru livrare și utilizare directă care nu necesită reambalare, într-un loc care dispune de instalații corespunzătoare de eliminare a deșeurilor. Cartofii destinați plantării pot fi manipulați în același loc numai dacă sunt manipulați separat sau după curățarea și dezinfectarea acestuia; sau

— utilizarea acestora drept cartofi de consum destinați prelucrării industriale după livrarea directă și imediată la o fabrică de prelucrare care dispune de instalații corespunzătoare de eliminare a deșeurilor, precum și de un sistem care permite curățarea și dezinfectarea cel puțin a vehiculelor care părăsesc fabrica; sau

— un alt mod de utilizare sau eliminare, în măsura în care s-a stabilit că nu există niciun risc identificabil de răspândire a organismului și a fost supus aprobării de către organismele oficiale responsabile.

3. Metodele corespunzătoare de curățare și de dezinfectare a obiectelor menționate la art. 8 alin. (3) sunt cele prin care s-a stabilit că nu există niciun risc identificabil de răspândire a organismului și sunt aplicate sub control oficial.

4. Măsurile care trebuie puse în aplicare în zona delimitată, stabilită conform art. 5 alin. (1) lit. c), menționate la art. 8 alin. (4) includ:

4.1. în locurile de producție declarate ca fiind contaminate conform art. 5 alin. (1) lit. a):

a) pe un teren declarat contaminat conform art. 5 alin. (1) lit. a):

(i) pe durata a minimum 3 ani care urmează anului contaminării declarate:

- se iau măsuri de eliminare a plantelor de cartof spontane și a celorlalte plante-gazdă spontane ale organismului; și
- nu se plantează și nu se seamănă niciun tubercul, plantă sau sămânță de cartof, nicio altă plantă-gazdă spontană a organismului sau nicio cultură pentru care există un risc identificabil de răspândire a organismului;
- în primul sezon de cultivare a cartofilor, care urmează după perioada specificată la liniuța anterioară și cu condiția ca terenul să fi fost găsit liber de plante spontane de cartof și de alte plante-gazde spontane ale organismului, în timpul inspecțiilor oficiale, timp de minimum doi ani consecutivi înainte de plantare, va fi autorizată numai producția de cartofi de consum și tuberculii recoltați trebuie să fie testați conform procedurii descrise în anexa nr. I;
- în sezonul de cultură a cartofilor, care urmează celui menționat la liniuța anterioară și după un ciclu adecvat de rotație, care trebuie să fie de minimum 2 ani, se autorizează plantarea cartofilor de sămânță pentru producția de cartofi de sămânță sau de consum și se efectuează supravegheri oficiale, conform art. 2 alin. (1); sau

(ii) pe durata a 4 ani de cultură care urmează anului contaminării declarate:

- se iau măsuri de eliminare a plantelor spontane de cartof și a celorlalte plante-gazde ale organismului prezente spontan; și
- terenul trebuie să fie lăsat și menținut fie necultivat, fie ca pășune permanentă și, în acest caz, este frecvent cosit scurt sau folosit la pășunat intensiv;
- în primul sezon de cultivare a cartofilor, care urmează după perioada specificată la liniuța anterioară și cu condiția ca terenul să fi fost găsit liber de plante spontane de cartof și de alte plante-gazde spontane ale organismului, în timpul inspecțiilor oficiale, timp de minimum 2 ani consecutivi înainte de plantare, se va autoriza producția de cartofi de sămânță sau de consum și tuberculii recoltați vor fi testați conform procedurii descrise în anexa nr. I;

b) în toate celelalte terenuri din locul de producție contaminat și cu condiția ca organismele oficiale responsabile să dobândească certitudinea că riscul reprezentat de plantele spontane de cartof și de alte plante-gazdă spontane ale organismului a fost eliminat:

— în timpul anului de cultură care urmează anului contaminării declarate fie nu se plantează și nu se seamănă niciun tubercul, plantă sau sămânță de cartof sau nicio altă plantă-gazdă spontană a organismului; sau

— sămânța de cartof certificată poate fi plantată numai pentru producția de cartofi de consum;

— în timpul celui de-al doilea an de cultură care urmează anului contaminării declarate, numai sămânța certificată sau cartofii de sămânță testați oficial pentru absența putregaiului inelar și cultivați sub control oficial în locurile de producție, altele decât cele menționate la pct. 4.1, vor fi plantați pentru producția de cartofi de sămânță sau de consum;

— cel puțin în timpul celui de-al treilea an de cultură care urmează anului contaminării declarate, numai cartofii de sămânță certificați sau cartofii de sămânță cultivați sub control oficial din cartofi de sămânță certificați vor fi plantați pentru producția de cartofi de sămânță sau de consum;

— în timpul fiecăruia dintre anii de cultură menționați la liniuțele anterioare se iau măsuri de eliminare a plantelor spontane de cartof, precum și a altor plante-gazdă spontane ale organismului și în fiecare câmp cu cartofi se efectuează teste oficiale asupra cartofilor recoltați, conform procedurii descrise în anexa nr. I;

c) imediat după declararea contaminării conform art. 5 alin. (1) lit. a) și după primul an de cultură care urmează, toate utilajele și toate instalațiile de depozitare de la locul de producție implicate în producția de cartofi vor fi curățate și dezinfectate corespunzător, folosind metode corespunzătoare, specificate la pct. 3;

d) într-o unitate de producție în cultură protejată unde este posibilă înlocuirea completă a mediului de cultură:

— nu se plantează și nu se seamănă niciun tubercul, nicio plantă sau sămânță, decât în cazul în care unitatea de producție a fost supusă sub control oficial unor măsuri de eliminare a organismului și de îndepărtare a tuturor plantelor-gazdă, inclusiv, cel puțin, înlocuirea completă a mediului de cultură, precum și curățarea și dezinfectarea unității de producție și a tuturor echipamentelor, și în cazul în care unitățile fitosanitare au autorizat ulterior unitatea pentru producția de cartofi; și

— producția de cartofi va fi obținută din cartofi de sămânță certificați sau din minituberculi ori microplante provenite din surse testate;

4.2. în interiorul zonei delimitate și fără a prejudicia măsurile enumerate la pct. 4.1 se aplică următoarele măsuri:

a) imediat după declararea contaminării toate mașinile și instalațiile de depozitare situate în astfel de locuri de producție trebuie să fie curățate și dezinfectate corespunzător, în conformitate cu metodele corespunzătoare menționate la pct. 3;

b) imediat după declararea contaminării și timp de cel puțin 3 sezoane de cultură:

— se asigură supravegherea de către unitățile fitosanitare a spațiilor în care se cultivă, depozitează sau se manipulează tuberculi de cartofi, precum și a spațiilor în care, pe bază de contract, funcționează echipamente destinate producției de cartofi;

— se impune ca în zona respectivă să fie plantată doar sămânță certificată sau sămânță cultivată sub control oficial, pentru toate culturile de cartofi, și testarea cartofilor de sămânță recoltați din locurile de producție declarate ca fiind probabil contaminate conform art. 5 alin. (1) lit. b);

— se impune, pentru toate spațiile din cadrul zonei, manipularea separată a stocurilor din recolta de cartofi de sămânță față de cele destinate consumului sau punerea în aplicare a unui sistem de curățare și dezinfectare între manipularea stocurilor de cartofi de sămânță și a celor de consum;

— se efectuează inspecții oficiale, conform art. 2 alin. (1);

c) se stabilește, atunci când este cazul, un program de înlocuire a tuturor stocurilor de cartofi de sămânță în decursul unei perioade corespunzătoare.

#### *ANEXA Nr. V*

Pentru a preveni orice risc identificabil de răspândire a organismului, metodele de eliminare a deșeurilor, aprobate în mod oficial și prevăzute în anexa nr. IV pct 1, respectă următoarele dispoziții:

(i) deșeurile de cartof (inclusiv cartofii eliminați și cojile) și orice alt deșeu solid asociat cartofilor (inclusiv pământ, pietre și alte resturi) vor fi eliminate:

— într-un loc autorizat de distrugere a deșeurilor, în care nu există niciun risc identificabil de propagare a organismului în mediul înconjurător, de exemplu, prin infiltrare în terenurile agricole. Deșeurile sunt transportate direct la locul respectiv, în condiții de izolare care previn orice risc de pierdere; sau

— prin incinerare; sau

— prin alte măsuri, în situația în care s-a stabilit că măsurile respective nu prezintă niciun risc identificabil de răspândire a organismului. Măsurile stabilite vor fi notificate Comisiei și celorlalte state-membre;

(ii) deșeurile lichide: înainte de eliminare, deșeurile lichide ce conțin particule solide în suspensie trebuie să fie supuse unui procedeu de filtrare sau de sedimentare pentru a le îndepărta. Aceste particule solide vor fi eliminate conform pct. (i).

Apoi, deșeurile lichide vor fi:

— complet încălzite la o temperatură de 60°C timp de cel puțin 30 de minute înainte de a fi eliminate; sau

— eliminate într-un alt mod, cu aprobare oficială și sub control oficial, astfel încât să nu existe niciun risc identificabil ca deșeurile să intre în contact cu terenurile agricole.

Detaliile vor fi notificate Comisiei și celorlalte state membre.

Diferitele proceduri descrise în prezenta anexă se aplică în egală măsură și deșeurilor asociate cu manipularea, eliminarea și tratarea loturilor contaminate.

---

**EDITOR: PARLAMENTUL ROMÂNIEI — CAMERA DEPUTAȚILOR**

---

„Monitorul Oficial“ R.A., Str. Parcului nr. 65, sectorul 1, București; C.I.F. RO427282,  
IBAN: RO55RNCB0082006711100001 Banca Comercială Română — S.A. — Sucursala „Unirea“ București  
și IBAN: RO12TREZ7005069XXX000531 Direcția de Trezorerie și Contabilitate Publică a Municipiului București  
(alocat numai persoanelor juridice bugetare)

Tel. 318.51.29/150, fax 318.51.15, E-mail: marketing@ramo.ro, Internet: www.monitoruloficial.ro

Adresa pentru publicitate: Centrul pentru relații cu publicul, București, șos. Panduri nr. 1,  
bloc P33, parter, sectorul 5, tel. 411.58.33 și 410.47.30, fax 410.77.36 și 410.47.23

Tiparul: „Monitorul Oficial“ R.A.



5 948368 204249