

KOMISJONI DIREKTIIV 2006/63/EÜ,

14. juuli 2006,

millega muudetakse haigusetekitaja *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* tõrjet käsitleva nõukogu direktiivi 98/57/EÜ II-VII lisa

EUROOPA ÜHENDUSTE KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Ühenduse asutamislepingut,

võttes arvesse nõukogu 20. juuli 1998. aasta direktiivi 98/57/EÜ, mis käsitleb haigusetekitaja *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* tõrjet, ⁽¹⁾ eriti selle artiklit 11,

ning arvestades järgmist:

- (1) Üks tähtsamaid kartulile ja tomatile kahjulikke organisme on *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, mis on kartuli pruun-baktermädaniku ning kartulite ja tomatite bakteriaalse närbumistõve haigusetekitaja (edaspidi "organism").
- (2) Organism esineb siiani mõnes ühenduses osas.
- (3) Direktiivis 98/57/EÜ on sätestatud üksikasjalikud meetmed, mida liikmesriigid peavad võtma organismi vastu, et kindlaks teha selle asukoht ja levik, vältida selle esinemist ja levikut, avastamise korral vältida selle levikut ja tõrjuda haigust likvideerimise eesmärgil.
- (4) Vahepeal on toimunud märkimisväärne areng bioloogias ning organismi avastamis- ja kindlaksmääramismenetluses, organismi tõrjel saadud praktiliste kogemuste toel tuleks läbi vaadata mitmed tõrjemeetmetega seotud tehnilised sätted.
- (5) Sellise arengu tulemusel on ilmselt vajalik läbi vaadata ja ajakohastada direktiivi 98/57/EÜ teatavates lisades olevad meetmed.
- (6) Avastamis- ja kindlaksmääramismenetlusele on inkorporeeritud moodne avastamismenetlus fluorestsents *in situ* hübriidsatsioon (FISH). Hõlmatud on polümeraasi ahelreaktsioon (*polymerase chain reaction* – PCR) ning praeguse

avastamis- ja kindlaksmääramismenetluse erinevate tehniliste osade täiustused, samuti organismi avastamis- ja kindlaksmääramismetodid teistes peremeestaimedes peale kartuli ning vees ja mullas.

- (7) Tõrjemeetmete tehniliste osade puhul on täiendatud järgmisi osi: laboratoorselt analüüsitud proovide säilitamine nii, et oleks võimalik tagada organismi tagantjärele kindlakstegemine, võimaliku saastumise ulatuse kindlaksmääramiseks vajalikud tegurid, organismi mis tahes kinnitatud esinemisest ja asjaomasest saastunud tsoonist teatamise üksikasjad, saastunuks tunnistatud tootmiskohtades ja piiritletud tsoonides rakendatavad meetmed. Lisaks on inkorporeeritud mõned sätted tomati kohta, et võtta rohkem arvesse selle taime asjakohasust organismi peremeestaimena.
- (8) Käesoleva direktiiviga ette nähtud meetmed on kooskõlas alalise taimetervise komitee arvamusega,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA DIREKTIIVI:

Artikkel 1

Direktiivi 98/57/EÜ II–VII lisa asendatakse käesoleva direktiivi lisas olevate vastavate tekstidega.

Artikkel 2

1. Liikmesriigid võtavad vastu ja avaldavad käesoleva direktiivi järgimiseks vajalikud õigusnormid hiljemalt 31. märtsiks 2007. Liikmesriigid edastavad nende normide teksti ning normide ja käesoleva direktiivi vastavustabeli viivitamata komisjonile.

Liikmesriigid kohaldavad neid norme alates 1. aprillist 2007.

Kui liikmesriigid need normid vastu võtavad, lisavad nad nendes normidesse või nende normide ametliku avaldamise korral nende juurde viite käesolevale direktiivile. Viitamise viisi näevad ette liikmesriigid.

⁽¹⁾ EÜT L 235, 21.8.1998, lk 1.

2. Liikmesriigid edastavad viivitamata komisjonile käesoleva direktiiviga reguleeritavas valdkonnas nende poolt vastu võetud põhiliste riigisiseste õigusnormide teksti.

Artikkel 3

Käesolev direktiiv jõustub kolmandal päeval pärast selle avaldamist *Euroopa Liidu Teatajas*.

Artikkel 4

Käesolev direktiiv on adresseeritud liikmesriikidele.

Brüssel, 14. juuli 2006

Komisjoni nimel
komisjoni liige
Markos KYPRIANOU

LISA

"II LISA

HAIGUSETEKITAJA *RALSTONIA SOLANACEARUM* (SMITH) YABUUCHI ET AL. DIAGNOOSIMISE, AVASTAMISE JA KINDLAKSMÄÄRAMISE ANALÜÜSIMETOODIKA

AANALÜÜSIMETOODIA KOHALDAMISALA

Käesoleva meetoodikaga kirjeldatakse eri menetlusi, mis on seotud järgmisega:

- i) pruun-baktermädaniku diagnoosimisega kartulimugulates ja bakteriaalse närbumistõve diagnoosimisega kartulis ja tomatil ja mõnedes teistes peremeestaimedes;
- ii) bakteri *Ralstonia solanacearum* avastamisega kartulimugulates, kartulis ja tomatil ning mõnedes teistes peremeestaimedes, vees ja mullas;
- iii) bakteri *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*) kindlaksmääramisega.

SISUKORD

	Lehekülg
Üldpõhimõtted	40
I JAGU Analüüsimetoodika rakendamine	40
1. Avastusmetoodika pruun-baktermädaniku ja bakteriaalse närbumistõve (<i>R. solanacearum</i>) diagnoosimiseks pruun-baktermädaniku või bakteriaalse närbumistõve sümptomitega kartulimugulates ja kartulis, tomatil ja teistes peremeestaimedes	40
2. Haigusetekitaja <i>R. solanacearum</i> avastamis- ja kindlaksmääramismetoodika asümptomaatiliste kartulimugulate proovides	43
3. Haigusetekitaja <i>R. solanacearum</i> avastamis- ja kindlaksmääramismetoodika asümptomaatiliste kartuli, tomati ja teiste peremeestaimede proovides	46
II JAGU Haigusetekitaja <i>R. solanacearum</i> üksikasjalikud avastamise meetodid kartulimugulates ja kartulis, tomatil ja teistes peremeestaimedes, millel on pruun-baktermädaniku või bakteriaalse närbumistõve sümptomid	48
1. Sümptomid	48
2. Kiirsõelkatsed	48
3. Bakterite isoleerimine	49
4. Haigusetekitaja <i>R. solanacearum</i> identifitseerimisanalüüsid	49
III JAGU 1. Haigusetekitaja <i>R. solanacearum</i> üksikasjalikud avastamis- ja kindlaksmääramismeetodid asümptomaatiliste kartulimugulate proovides	49
1.1. Proovi ettevalmistamine	49
1.2. Analüüsimine	51
2. Haigusetekitaja <i>R. solanacearum</i> üksikasjalikud avastamis- ja kindlaksmääramismeetodid asümptomaatiliste kartuli, tomati ja teiste taimede proovides	51
2.1. Proovi ettevalmistamine	51
2.2. Analüüsimine	52
IV JAGU 1. Haigusetekitaja <i>R. solanacearum</i> avastamis- ja kindlaksmääramismetoodika vees	53
2. Haigusetekitaja <i>R. solanacearum</i> avastamis- ja kindlaksmääramismeetodid vees	55
2.1. Proovi ettevalmistamine	55
2.2. Analüüsimine	55
V JAGU 1. Haigusetekitaja <i>R. solanacearum</i> avastamis- ja kindlaksmääramismetoodika mullas	56
2. Haigusetekitaja <i>R. solanacearum</i> avastamis- ja kindlaksmääramismeetodid mullas	58
2.1. Proovide ettevalmistamine	58
2.2. Analüüsimine	58

	Lehekülg
VI JAGU	
Haigusetekitaja <i>R. solanacearum</i> avastamise ja kindlaksmääramise optimeeritud protokollid	58
A. Diagnostilised ja avastamisanalüüsid	58
1. Varrelima test	58
2. Polü- β -hüdrosübutüraadi graanulite tuvastamine	58
3. Seroloogiline aglutinatsiooni analüüs	59
4. Selektiivne isoleerimine	60
4.1. Selektiivsöötmele väljakülvamine	60
4.2. Rikastamismenetlus	60
5. Immunofluorestsentsitest (IF-analüüs)	61
6. Polümeraasi ahelreaktsiooni test (PCR-analüüs)	64
6.1. DNA puhastamismeetodid	65
a) Pastroki (2000) meetod	65
b) Muud meetodid	65
6.2. PCR-test	66
6.3. PCR-produkti analüüs	66
7. In situ fluorestsentshübridisatsioon (FISH-analüüs)	67
8. Ensüümne immunosorbenttest (ELISA-analüüs)	69
a) Kaudne ELISA	69
b) DASI ELISA (kaudne ELISA sandwich-meetodil)	70
9. Biotest	71
B. Identifitseerimisanalüüsid	72
1. Toitumuslikud ja ensümaatilised identifitseerimisanalüüsid	72
2. IF-analüüs	72
3. ELISA-analüüs	73
4. PCR-analüüs	73
5. FISH-analüüs	73
6. Rasvhapete profileerimine (FAP)	73
7. Tüve iseloomustamise meetodid	73
7.1. Biotüübi määramine	73
7.2. Genoomse "sõrmejäljendi" võtmine	74
7.3. PCR-meetodid	74
C. Kinnitusanalüüs	74
1. liide	76
Protokollide optimeerimise ja valideerimisega tegelevad laborid	76
2. liide	77
Söötmed haigusetekitaja <i>R. solanacearum</i> isoleerimiseks ja kultiveerimiseks	77
3. liide	79
A) Müügil olevad standardiseeritud kontrollmaterjalid	79
B) Kontrollide ettevalmistamine	80
4. liide	82
Analüüsimenetluste puhvid	82
5. liide	85
Bakterite koguse määramine IF-ja FISH-analüüsid	85
6. liide	86
Valideeritud PCR-protokollid ja -reaktiivid	86
7. liide	91
FISH-analüüsi valideeritud reaktiivid	91
8. liide	93
Baklažaani- ja tomatikultuuride kasvatamistingimused	93
Viited	94

ÜLDPÕHIMÕTTED

Erinevate meetodite optimeeritud protokollid, valideeritud reaktiivid ning üksikasjad analüüsi ja kontrollainete ettevalmistuse kohta on sätestatud liidetes. 1. liites on sätestatud nende laborite nimekiri, mis tegelesid protokollide optimeerimisega ja valideerimisega.

Kuna protokollid hõlmavad ohtliku organismi avastamist ja bakteri *R. solanacearum* elujõuliste kultuuride kasutamist kontrollmaterjalina, tuleb menetlus läbi viia sobivates karantiinitingimustes, kus on kohased jäätmete kõrvaldamise seadmed ja ametlike taimekarantiini asutuste välja antud litsentside kohased tingimused.

Analüüsiparameetrid peavad tagama bakteri *R. solanacearum* järjepideva ja uuesti korratava avastamise valitud meetodites sätestatud piirmäärades.

Oluline on positiivsete kontrollproovide täpne ettevalmistamine.

Analüüsides tegemisel vastavalt nõutavatele piirmääradele tuleb tähelepanu pöörata ka seadmete õige seadistusele, hooldusele ja kalibreerimisele, reaktiivide hoolikale käitlemisele ja säilitamisele ning kõigile meetmetele, mille eesmärk on vältida proovide omavahelist saastumist, s.t positiivsete kontrollproovide eraldamisele analüüsivatest proovidest. Tuleb kohaldada kvaliteedikontrolli standardeid, et vältida halduslikke ja muid vigu, eelkõige seoses märgistamise ja dokumentidega.

Direktiivi 98/57/EÜ artikli 4 lõikes 2 osutatud haiguse esinemise kahtlus tähendab diagrammides määratletud proovi diagnostiliste või sõelkatsete positiivset tulemust. Esimese sõelkatse (IF-analüüs, PCR/FISH, selektiivne isoleerimine) positiivset tulemust tuleb kinnitada teise sõelkatsega, mis põhineb erineval bioloogilisel põhimõttel.

Kui esimese sõelkatse tulemus on positiivne, kahtlustatakse nakatumist bakteriga *R. solanacearum* ning tuleb teha teine sõelkatse. Kui teine sõelkatse annab positiivse tulemuse, on kahtlus leidnud kinnituse (haiguse esinemise kahtlus) ning tuleb jätkata analüüsides tegemist vastavalt meetodikale. Kui teine sõelkatse annab negatiivse tulemuse, ei peeta proovi bakteriga nakatunuks.

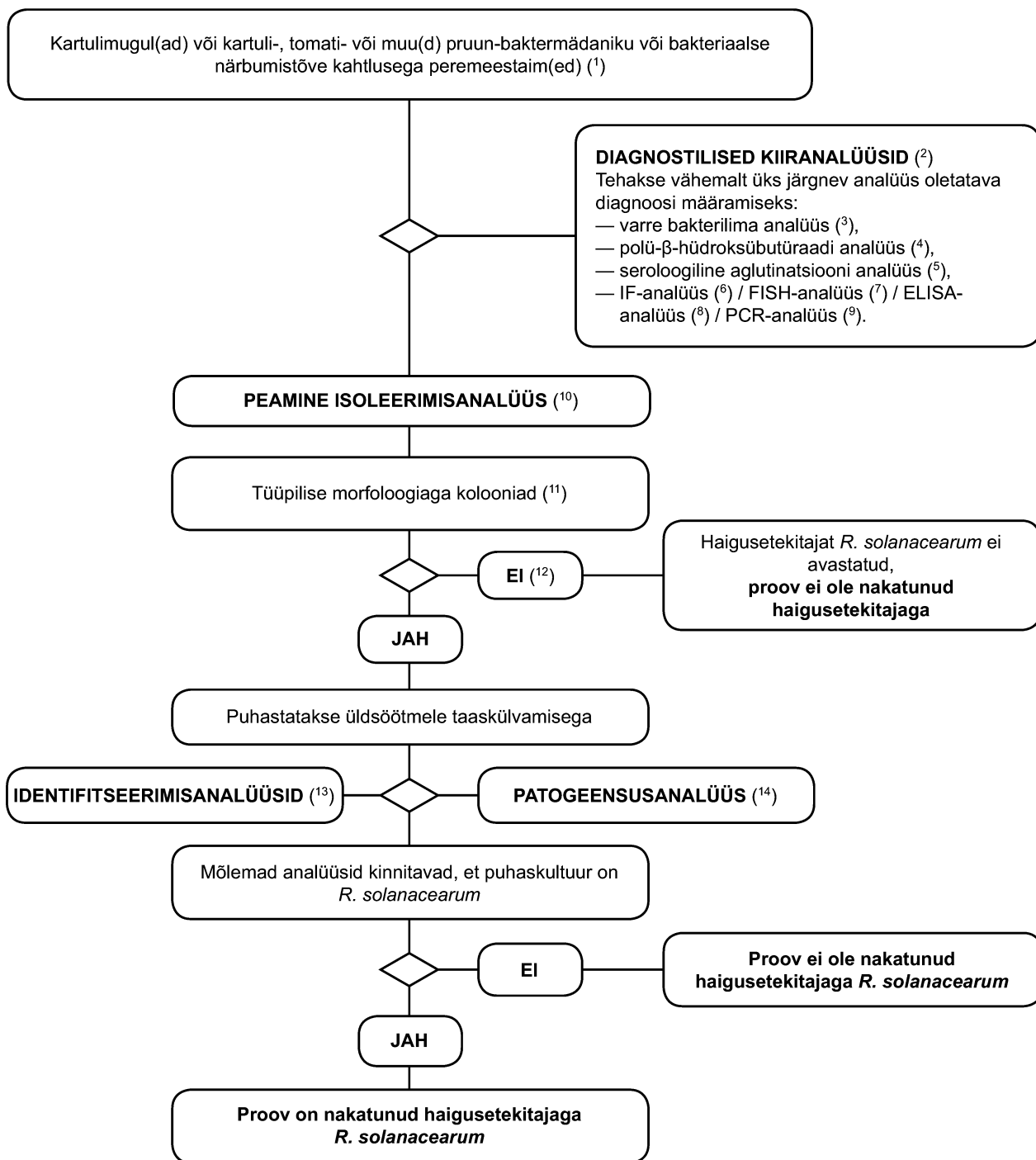
Direktiivi 98/57/EÜ artikli 5 lõikes 1 osutatud kinnitatud organismi olemasolu tähendab bakteri *R. solanacearum* puhaskultuuri isoleerimist ja identifitseerimist koos patogeensuse kinnitusega.

I JAGU

ANALÜÜSIMETOODIKA RAKENDAMINE

1. **Avastusmeetodika pruun-baktermädaniku ja bakteriaalse närbumistõve (*Ralstonia solanacearum*) diagnoosimiseks pruun-baktermädaniku ja bakteriaalse närbumistõve sümptomitega kartulimugulates ja kartulis, tomatid ja teistes peremeestaimedes**

Analüüsimeetodika on ette nähtud kartulimugulate ja -taimede puhul, millel esinevad tüüpilised või kahtlased pruun-baktermädaniku või bakteriaalse närbumistõve sümptomid. Siia kuuluvad kiiranalüüsid, saastunud juhtkoest patogeeni isoleerimine (selektiiv)söötmele ja positiivse tulemuse korral bakteri *Ralstonia solanacearum* kindlaksmääramine.



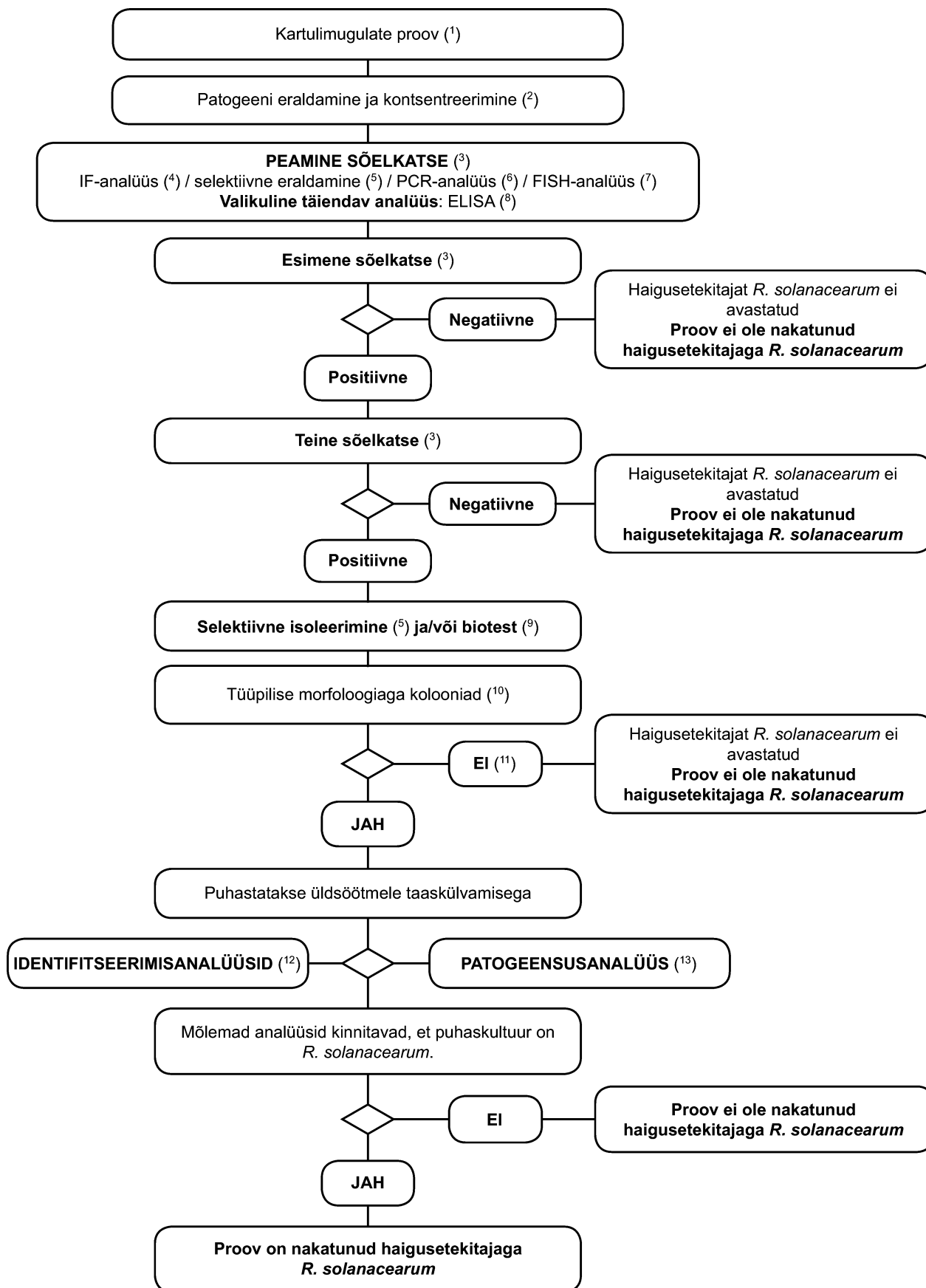
- (¹) Sümptomite kirjeldust vt II jao punktis 1.
- (²) Diagnostilised kiiranalüüsid hõlbustavad oletatava diagnoosi määramist, ent ei ole otsustava tähtsusega. Negatiivne tulemus ei ole alati patogeeni puudumise garantii.
- (³) Varre juhtkoe bakterilima voolavuse testi kirjeldatakse VI jao punktis A.1.
- (⁴) Bakterirakkude polü-β-hüdroksübutüraadi graanulite analüüsi kirjeldatakse VI jao punktis A.2.
- (⁵) Bakterilima või sümptomaatilise koe seroloogilisi aglutinatsioonianalüüse kirjeldatakse VI jao punktis A.3.
- (⁶) Vees suspendeeritud bakterilima või sümptomaatilise koe IF-analüüsi kirjeldatakse VI jao punktis A.5.
- (⁷) Vees suspendeeritud bakterilima või sümptomaatilise koe FISH-analüüsi kirjeldatakse VI jao punktis A.7.
- (⁸) Vees suspendeeritud bakterilima või sümptomaatilise koe ELISA-analüüsi kirjeldatakse VI jao punktis A.8.
- (⁹) Vees suspendeeritud bakterilima või sümptomaatilise koe PCR-analüüsi kirjeldatakse VI jao punktis A.6.
- (¹⁰) Patogeen on tavaliselt kergesti isoleeritav sümptomitega taimematerjalist lahjenduse laialikülvamise abil söötmeplaatidele (II jao punkt 3).
- (¹¹) Tüüpilise koloonia morfoloogia kirjeldus esitatakse II jao punkti 3 alapunktis d.
- (¹²) Infektsiooni edasiarenenud faaside kultiveerimine võib ebaõnnestuda saprofüütbakterite konkurentsi või liigkasvu tõttu. Kui haiguse sümptomid on tüüpilised, kuid bakteri isoleerimine annab negatiivse tulemuse, tuleb isoleerimist korrata, eelistatult selektiivsöötmele.
- (¹³) Bakteri *R. solanacearum* eeldatava puhaskultuuri saab usaldusväärsetl kindlaks määrata, kasutades VI jao punktis B kirjeldatud analüüsi. Alamliigi iseloomustamine ei ole kohustuslik, kuid on soovituslik iga uue juhtumi korral.
- (¹⁴) Patogeensusanalüüsi kirjeldatakse VI jao punktis C.

2. **Haigusetekiitaja *Ralstonia solanacearum* avastamis- ja kindlaksmääramismetoodika asümptomaatiliste kartulimugulate proovides**

Põhimõte

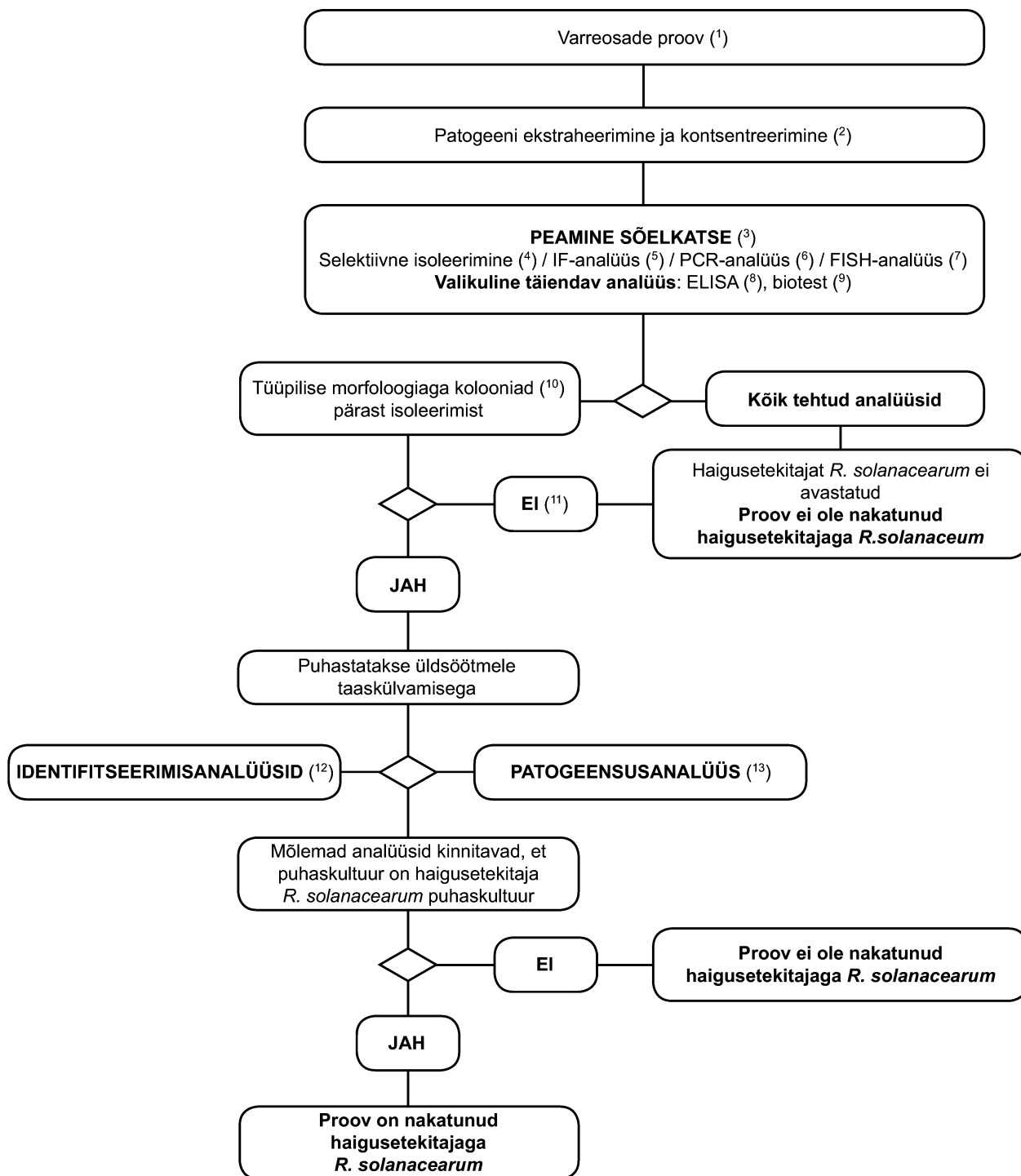
Analüüsimeetod on mõeldud latentsete nakkuste avastamiseks kartulimugulates. Erinevatel bioloogilistel põhimõtetel põhineva vähemalt kahe sõelkatse positiivse tulemuse korral³ tuleb patogeen isoleerida; kui isoleeritakse tüüpilised kolooniad, peab järgnema bakteri *R. solanacearum* puhaskultuuri identifitseerimine. Ainult ühe määramismeetodi positiivsest tulemusest ei piisa selleks, et lugeda proov kahtlaseks.

Sõelkatsed ja isolatsioonianalüüsid peavad võimaldama avastada 10^3 kuni 10^4 rakku resuspenseeritud bakterisademe milliliitri kohta, mis kuuluvad positiivse kontrollina igasse analüüsiseeriasse.



- (¹) Standardproovi suurus on 200 mugulat, kuid meetodit saab kasutada väiksema prooviga, kui 200 mugulat ei ole.
- (²) Patogeeni eraldamis- ja kontsentreerimismeetodeid kirjeldatakse III jao punktis 1.1.
- (³) Kui vähemalt kaks erinevatel bioloogilistel põhimõtetel põhinevat analüüsi annavad positiivse tulemuse, tuleb bakter isoleerida ja kinnitada. Kasutatakse vähemalt üht sõelkatset. Kui see sõelkatse annab negatiivse tulemuse, loetakse proov negatiivseks. Kui meetod annab positiivse tulemuse, tuleb teha veel üks või mitu erinevatel bioloogilistel põhimõtetel põhinevat sõelkatset esimese positiivse tulemuse tõendamiseks. Kui teise või järgmiste sõelkatsete tulemused on negatiivsed, loetakse proov negatiivseks. Täiendavaid analüüse ei ole vaja teha.
- (⁴) IF-analüüsi kirjeldatakse VI jao punktis A.5.
- (⁵) Selektiivse eraldamise analüüsi kirjeldatakse VI jao punktis A.4.
- (⁶) PCR-analüüsi kirjeldatakse VI jao punktis A.6.
- (⁷) FISH-analüüsi kirjeldatakse VI jao punktis A.7.
- (⁸) ELISA-analüüsi kirjeldatakse VI jao punktis A.8.
- (⁹) Biotesti kirjeldatakse VI jao punktis A.9.
- (¹⁰) Tüüpilise koloonia morfoloogia kirjeldus esitatakse II jao punktis 3 alapunktis d.
- (¹¹) Saprofüütbakterid võivad olla konkurendiks või inhibiitoriks ja selle tõttu võib kasvatamine või biotest ebaõnnestuda. Kui sõelkatsed on andnud positiivseid tulemusi, kuid bakteri isoleerimine annab negatiivse tulemuse, korratakse isoleerimisanalüüse sama bakterisademega või võetakse lisaks sama proovi lõigatud mugulate basaalse tipu juurest juhtkude ning vajaduse korral analüüsitakse lisaproove.
- (¹²) Haigusetekiitaja *R. solanacearum* eeldatava puhaskultuuri saab usaldusväärselt kindlaks määrata, kasutades VI jao punktis B kirjeldatud analüüse.
- (¹³) Patogeensusanalüüsi kirjeldatakse VI jao punktis C.

3. Haigusetekitaja *Ralstonia solanacearum* avastamis- ja kindlaksmääramismetoodika asümptomaatiliste kartuli, tomati ja teiste peremeestaimede proovides



- (¹) Soovitavad proovide suurused on III jao punktis 2.1.
- (²) Patogeeni ekstraheerimis- ja kontsentreerimismeetodeid kirjeldatakse III jao punktis 2.1.
- (³) Kui vähemalt kaks erinevatel bioloogilistel põhimõtetel põhinevat analüüsi annavad positiivse tulemuse, tuleb bakter isoleerida ja kinnitada. Kasutatakse vähemalt üht sõelkatset. Kui see sõelkatse annab negatiivse tulemuse, loetakse proov negatiivseks. Kui meetod annab positiivse tulemuse, tuleb teha veel üks või mitu erinevatel bioloogilistel põhimõtetel põhinevat sõelkatset esimese positiivse tulemuse tõendamiseks. Kui teise või järgmiste sõelkatsete tulemused on negatiivsed, loetakse proovi negatiivseks. Täiendavaid analüüse ei ole vaja teha.
- (⁴) Selektiivse isoleerimise analüüsi kirjeldatakse VI jao punktis A.4.
- (⁵) IF-analüüsi kirjeldatakse VI jao punktis A.5.
- (⁶) PCR-analüüsi kirjeldatakse VI jao punktis A.6.
- (⁷) FISH-analüüsi kirjeldatakse VI jao punktis A.7.
- (⁸) ELISA-analüüsi kirjeldatakse VI jao punktis A.8.
- (⁹) Biotesti kirjeldatakse VI jao punktis A.9.
- (¹⁰) Tüüpilise koloonia morfoloogia kirjeldus on esitatud II jao punkti 3 alapunktis d.
- (¹¹) Saprofüütbakterid võivad olla konkurendiks või inhibiitoriks ja selle tõttu võib kasvatamine või biotest ebaõnnestuda. Kui määramismeetodiga saadakse positiivseid tulemusi, kuid isoleerimiskatsed on negatiivsed, korratakse isoleerimiskatseid.
- (¹²) Bakteri *R. solanacearum* eeldatava puhaskultuuri saab usaldusväärselt kindlaks määrata, kasutades VI jao punktis B kirjeldatud analüüse.
- (¹³) Patogeensusanalüüsi kirjeldatakse VI jao punktis C.

II JAGU

**HAIGUSETEKITAJA RALSTONIA SOLANACEARUM ÜKSIKASJALIKUD AVASTAMISMEETODID
KARTULIMUGULATES JA KARTULIS, TOMATIS JA TEISTES PEREMEESTAIMEDES, MILLEL ON
PRUUN-BAKTERMÄDANIKU VÕI BAKTERIAALSE NÄRBUMISTÕVE SÜMPTOMID****1. Sümptomid** (vt veebileht <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>)**1.1. Sümptomid kartulil**

Kartulitaim. Infektsiooni varajast staadiumit põllul iseloomustab päevaste kõrgete temperatuuride juures närbumine alates alumistest lehtedest taime tipu suunas, kusjuures öösel taim taastub. Närbumise varajastes staadiumides jäävad lehed rohelisteks, kuid hiljem muutuvad need kollaseks ja pruuniks ning kärбуvad. Esineb ka lehtede allapoole keerumist. Ühe võrse või kogu taime närbumine muutub kiiresti pöördumatuks ning lõpeb taime kokkuvarisemise ja hukuga. Närbunud taime varre ristlõike juhtkude on tavaliselt pruuniks muutunud ning piimjas bakterilima immitseb lõikepinnalt või eritub pigistamisel. Kui läbilõigatud taimevars on asetatud vertikaalselt vette, on näha limaniitide väljavoolamist juhtkimpudest.

Kartulimugul. Kartulimugulast tuleb teha ristlõike basaalse (stoolonipoolse) tipu lähedalt või lõigata pikisuunaliselt üle stooloni tipu. Infektsiooni varajane staadium on äratuntav juhtkoeringi klaasistumisena ja värvusemuutusena klaasjaskollakast helepruunini ning ringist võib lõikekohal pärast mõne minuti möödumist iseeneslikult erituda kahvatu kreemjas bakteriaalne eritis. Hiljem muutub juhtkoering selgelt eristatavalt pruuniks ning kärbumine võib ulatuda põhikoeni. Edasiarenenud infektsioonifaasis võib bakterilima erituda ka basaalsest tipust või kartulisilmadest, põhjustades mullaosakeste kleepumist mugulale. Juhtkoe sisemise kokkuvajumise tõttu võivad koorel tekkida punakaspruunid sissevajunud kahjustused. Haiguse edasiarenenud faasides on tavapärase sekundaarsete seente ja bakterite põhjustatud pehmete mädanike areng.

1.2. Sümptomid tomatil

Tomatitaim. Esimeseks nähtavaks sümptomiks on noorimate lehtede longuvajumine. Haigusetikitaja jaoks soodsate keskkonnatingimuste juures (mulla temperatuur umbes 25 °C: küllastunud niiskus) esineb lehtede allapoole keerumine ja taime osaline või täielik närbumine, millele järgneb kogu taime kokkuvarisemine mõne päeva jooksul. Vähem soodsate tingimuste korral (mulla temperatuur alla 21 °C) esineb närbumist vähem, kuid varrel võib areneda suurel hulgal lisajuuri. Varre alaosal võib märgata vesiseid triipe, mis on juhtkoes esineva nekroosi tunnuseks. Kui varrest teha ristlõige, eritub pruuniks muutunud juhtkoest valget või kollakat bakterilima.

1.3. Sümptomid teistel peremeestaimedel

Hariliku maavitsa *Solanum dulcamara* ja musta maavitsa *S. nigrum* taimed. Kui mulla temperatuur ei ületa 25 °C ja inokulaadi tase ei ole äärmiselt kõrge (st *S. nigrum* ei kasva haige kartuli- või tomatitaimede kõrval), täheldatakse looduslikes tingimustes nendel umbrohtudest peremeestaimedel närbumissümptomeid harva. Kui närbumine ilmneb, on sümptomid samad mis tomatil. Mittenärbunud *S. dulcamara* taimedel, mille varred ja juured kasvavad vees, võib ilmuda varre ala- või veealuste osade seesmine ristlõikel nähtav juhtkudede helepruuniks muutumine. Kui läbilõigatud taimevars on asetatud vertikaalselt vette, võib läbilõigatud juhtkudedest erituda bakterilima või moodustuda limaniite, seda isegi närbumissümptomite puudumisel.

2. Kiirsõelkatsed

Kiirmääramismeetodid võivad hõlbustada oletatava diagnoosi määramist, ent ei ole otsustava tähtsusega. Kasutatakse üht või mitut järgmistest valideeritud analüüsides:

2.1. Varrelima test

(Vt VI jao punkt A.1.)

2.2. Polü-β-hüdroksübutüraadi (PHB) graanulite tuvastamine

Haigusetikitaja *R. solanacearum* rakkudes esinevaid iseloomulikke polü-β-hüdroksübutüraadi (PHB) graanuleid saab nähtavaks muuta nakatunud koe bakterilima läbi leegi fikseeritud äiete värvimisel mikroskoobi alusklaasil värvainetega Niiluse sinine A ja Sudaani must B (vt V jao punkt A.2.).

2.3. Seroloogiline aglutinatsiooni analüüs

(Vt VI jao punkt A.3.)

2.4. Muud analüüsid

Teised sobilikud kiirmääramismeetodid on IF-analüüs (vt VI jao punkt A.5.), FISH-analüüs (vt VI jao punkt A.7.), ELISA-analüüs (vt VI jao punkt A.8.) ja PCR-analüüs (vt VI jao punkt A.6.).

3. Bakterite isoleerimine

- a) Kartulimugula juhtkoeringi muutunud värvusega osast või kartuli- või tomati- või muu närbunud peremees- taime varre juhtkimpudest eemaldatakse eritist või mõned lõiked. Lahustatakse väikeses koguses steriilses destilleeritud vees või 50 mM fosfaatpuhvrts (4. liide) ja jäetakse 5–10 minutiks seisma.
- b) Suspensioonist valmistatakse rida kümnekordseid lahjendusi.
- c) Suspensioonist ja selle lahjendustest mõõdetakse 50–100 µl üldsöötmele (NA, YPGA või SPA; vt 2. liide) ja/või Kelmani tetrasooliumsöötmele (2. liide) ja/või valideeritud selektiivsöötmele (nt SMSA; vt 2. liide). Kasutatakse söötmeplaadil joonkülvvi tehnikat või vastava lahjenduse laiiali külvamist söötmeplaadile. Vajaduse korral valmistatakse eraldi söötmeplaadid positiivse haigusetekitaja kontrolli jaoks, kasutades *R. solanacearum*'i biotüübi 2 tüve.
- d) Plaaite inkubeeritakse 28 °C juures 2–6 päeva.
 - Üldsöötmel on virulentse *R. solanacearum*'i kolooniad kreemikasvalged, lamedad, ebaihtlase kujuga, fluidaalsed ning sageli iseloomulike spiraalsete keeretega keskel. *R. solanacearum*'i avirulentsed vormid moodustavad väikesi ümmargusi mittevedelaid võilaadseid kolooniaid, mis on täiesti kreemjasvalged.
 - Kelmani tetrasoolium- või SMSA-söötmele on keerved veripunased. *Ralstonia solanacearum*'i avirulentsed vormid moodustavad väikesi ümmargusi mittevedelaid võilaadseid kolooniaid, mis on täiesti sügavpunased.

4. *R. solanacearum*'i kindlaksmääramise analüüsid

R. solanacearum'i eeldatavad isolaadid saab kindlaks määrata VI jao punktis B esitatud analüüsidesga.

III JAGU

1. Haigusetekitaja *Ralstonia solanacearum* üksikasjalikud avastamis- ja kindlaksmääramismeetodid asümptomaatiliste kartulimugulate proovides

1.1. Proovi ettevalmistamine

Märkus

- Standardproovi suurus on 200 mugulat analüüsi kohta. Intensiivsem proovivõtmine eeldab rohkem analüüsi, kuid proovi suurus jääb samaks. Suurem mugulate arv proovis põhjustab tulemuste inhibeerimise või nende tõlgendamise keerukuse. Siiski saab meetodit kohaldada ka alla 200 mugulaga proovi puhul, kui rohkem mugulaid ei ole.
- Kõigi allpool kirjeldatud avastamise meetodite valideerimine põhineb analüüsidel, mis on tehtud 200 mugulast koosneva prooviga.
- Allpool kirjeldatud kartuliekstrakti saab kasutada ka kartuli-ringmädaniku bakteri *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* avastamiseks.

Vabatahtlik eeltöötlemine enne proovi valmistamist

- a) Proove inkubeeritakse 25–30 °C juures kuni kaks nädalat enne analüüsimist, et ergutada *R. solanacearum*'i populatsioonide paljunemist.
- b) Mugulad pestakse. Iga proovi järel kasutatakse kohaseid desinfektsioonivahendeid (klooriühendeid, kui kasutatakse PCR-katset, et eemaldada patogeenne DNA) ja pesuaineid. Mugulad kuivatatakse õhu käes. Pesemine on eriti kasulik (kuid mitte nõutav) nende proovide puhul, millel on liiga palju mulda, ning kui tehakse PCR-analüüsi või bakterite otsest isoleerimist.

- 1.1.1. Puhta ja desinfitseeritud skalpelli või juurviljanao abil eemaldatakse koor mugula basaalse (stoolonipoolse) tipu juurest nii, et juhtkude tuleb nähtavale. Basaalse tipu juures lõigatakse väike juhtkoe südamik ettevaatlikult välja nii, et muid kudesid tuleks kaasa võimalikult vähe (vt veebileht <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Märkus: iga pruunmädaniku kahtlase sümptomiga mugul hoitakse alles ja sellega tehakse eraldi analüüsid.

Kui basaalse tipusüdamiku eemaldamisel ilmneb pruun-baktermädaniku kahtlaseid sümptomeid, tuleks teha selle mugula visuaalne kontroll ja mugulat lõigata basaalse tipu juures. Kõiki kahtlaste sümptomitega lõigatud mugulaid tuleks hoida korgistumiseks vähemalt kaks päeva toatemperatuuril ning seejärel säilitada jahutatult (4–10 °C) kohastes karantiinitingimustes. Kõiki mugulaid, sealhulgas kahtlaste sümptomitega, tuleks säilitada vastavalt III lisale.

- 1.1.2. Basaalsed tipusüdamikud kogutakse kasutamata ühekordse kasutusega mahutitesse, mida saab sulgeda ja/või pitseerida (kui mahuteid kasutatakse uuesti, tuleks need põhjalikult puhastada ja desinfitseerida, kasutades klooriühendeid). Eelistatult tuleks eemaldatud basaalseid tipusüdamikke töödelda kohe. Kui see ei ole võimalik, hoitakse neid mahutis puhvrit lisamata, jahutatult mitte üle 72 tunni või toatemperatuuril mitte üle 24 tunni.

Basaalseid tipusüdamikke töödeldakse, kasutades üht järgmistest meetoditest.

- a) Südamikud kaetakse piisava koguse (umbes 40 ml) ekstraktsioonipuhvriga (4. liide) ja segatakse pöörleval lok-sutitil (50–100 pööret minutis) 4 tundi alla 24 °C juures või 16–24 tundi jahutatult.
- b) Südamikud homogeenitakse piisava koguse (umbes 40 ml) ekstraktsioonipuhvriga (4. liide) kas segistis (näiteks Waring või Ultra Thurax) või purustades need suletud ühekordse kasutusega matsratsioonikotis (näiteks Stomacheri või Bioreba tugev kilekott mõõtudega 150 mm × 250 mm; kiirgusteriilne), kasutades kummiva-sarat või sobivat peenustusseadet (näiteks Homex).

Märkus: kui proovid homogeenitakse segistis, on suur proovide ristsaastumise oht. Tuleb võtta ettevaatusabinõusid, et vältida aerosooli tekkimist või proovi lekkimist ekstraktsiooni käigus. Tagatakse asja steriliseeritud segistiterade ja -anumate kasu-tamine iga proovi korral. Kui kasutatakse PCR-analüüsi, välditakse DNA ülekandumist mahutites või peenustusseadmes. PCR-analüüsi tegemisel on soovitatav purustada ühekordse kasutusega kottides ja kasutada ühekordse kasutusega katseklaase.

- 1.1.3. Supernatant dekanteeritakse. Kui lahus on liiga hägune, selitatakse see madalal kiirusel tsentrifuugides (mitte üle 180 g 10 minutit jooksul temperatuuril 4–10 °C) või vaakumfiltrerimisega (40–100 µm), pestes filtrit täiendava ekstraktsioonipuhvriga (10 ml).

- 1.1.4. Bakterifraktsioon kontsentreeritakse, tsentrifuugides 7 000 g juures 15 minutit (või 10 000 g juures 10 minutit) temperatuuril 4–10 °C, ning supernatant eemaldatakse bakterisadet segamata.

- 1.1.5. Bakterisade resuspendeeritakse 1,5 ml bakterisademe puhvris (4. liide). Haigusetkitaja *R. solanacearum* kontrolli-mise jaoks kasutatakse 500 µl, haigusetkitaja *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* jaoks 500 µl ja võrdlusees-märgil 500 µl. 500 µl võrdlusalikvoodile ja ülejäänud analüüsialikvoodile lisatakse steriilset glütserooli lõppkontsentratsiooni 10–25 % (v/v) saamiseks, loksutatakse ja säilitatakse temperatuuril –16 kuni –24 °C (näda-laid) või –68 kuni –86 °C (kuid). Analüüside tegemise ajal hoitakse analüüsialikvoote 4–10 °C juures.

Korduv külmutamine ja sulatamine ei ole soovitatav.

Kui ekstrakti tuleb transportida, tuleb seda teha külmkastis 24–48 tunni jooksul.

- 1.1.6. Kõiki *R. solanacearum*'i positiivseid kontrole ja proove tuleb käsitleda eraldi, et vältida saastumist. Seda tuleb jär-gida IF-objektiklaaside ja kõigi analüüside korral.

1.2. Analüüsimine

Vaata diagramme ja analüüsi kirjeldusi ning optimeeritud protokolle vastavates liidetes.

Selektiivne isoleerimine (vt VI jao punkt A.4.)

IF-analüüs (vt VI jao punkt A.5.)

PCR-analüüs (vt VI jao punkt A.6.)

FISH-analüüs (vt VI jao punkt A.7.)

ELISA-analüüs (vt VI jao punkt A.8.)

Biotest (vt VI jao punkt A.9.)

2. **Haigusetkitaja *R. solanacearum* üksikasjalikud avastamis- ja kindlaksmääramismeetodid asümptomaatiliste kartuli, tomati ja teiste peremeestaimede proovides**

2.1. Proovi ettevalmistamine

Märkus: haigusetkitaja *R. solanacearum* latentsete populatsioonide avastamiseks on soovitatav kasutada liitproove. Meetodit saab mugavalt kasutada kuni 200 varreosast koosnevate liitproovide puhul. Seirete läbiviimisel peaksid seired põhinema uuritava taimepopulatsiooni statistiliselt esindaval proovil.

2.1.1. 1–2 cm pikkused varreosad kogutakse suletud steriilsesse mahutisse järgmise proovivõtumenetluse kohaselt.

Tomatiseemikud. Iga varre alaosast, maapinna kohalt, eemaldatakse puhta desinfitseeritud noaga 1 cm pikkune osa.

Avamaal või kasvuhoones kasvatatud tomatitaimed. Puhta desinfitseeritud noaga eemaldatakse iga taime kõige madalam külgvõrse, lõigates vahetult põhivarre ühenduskoha kohal. Eemaldatakse iga külgvõrse kõige alumine 1 cm pikkune osa.

Teised peremeestaimed. Iga varre alaosast, maapinna kohalt, eemaldatakse puhta desinfitseeritud noa või oksakäärdega 1 cm pikkune osa. *S. dulcamara*'l ja teistel vees kasvavatel peremeestaimedel eemaldatakse veeluste varte või stoolonite 1–2 cm pikkused vesijuurtega osad.

Teatavas proovivõtukoahas proovi võttes on soovitatav analüüsida statistiliselt esindavat proovi, milleks võetakse proovivõtukoahast vähemalt 10 iga võimaliku umbrohu peremeestaime taime. Patogeeni avastamine on kõige usaldusväärsem hiliskevadel, suvel ja sügisel, vooluveekogudes kasvava mitmeaastase taime *Solanum dulcamara* looduslikku nakatumist saab määrata aasta ringi. Teadaolevateks peremeestaimedeks on isekülvanud kartulitaimed, harilik maavits *Solanum dulcamara*, must maavits *S. nigrum*, harilik ogaõun *Datura stramonium* ja teised sugukonna maavitsalised (*Solanaceae*) liigid. Peremeestaimedeks on ka pelargoon *Pelargonium* spp. ja harilik portulak *Portulaca oleracea*. Mõned Euroopas levinud umbrohuliigid, nagu odalehine malts *Atriplex hastata*, karvane ruse *Bidens pilosa*, kera-kadakkaer *Cerastium glomeratum*, valge hanemalts *Chenopodium album*, harilik vesikanep *Eupatorium cannabinum*, paljas võõrkakar *Galinsoga parviflora*, mürgtulikas *Ranunculus scleratus*, kerss *Rorippa* spp., oblikas *Rumex* spp., valge põisrohi *Silene alba*, longus põisrohi *S. nutans.*, paiseleht *Tussilago farfara* ja kõrvenõges *Urtica dioica*, võivad varjata teatavate keskkonnamitingimuste puhul juurtes ja/või risosfääris *R. solanacearum*'i biotüübi 2 / rassi 3 populatsioone.

Märkus: selles etapis saab teha sisemiste sümptomite (vaskulaarne värvumine või bakterilima) visuaalse vaatluse. Iga sümptomitega varreosa pannakse kõrvale ja sellega tehakse eraldi analüüsid (vt II jagu).

2.1.2. Varreosad desinfitseeritakse kergelt 70 % etanooliga ja kuivatatakse kohe kuivatuspaberiga. Seejärel töödeldakse varreosad, kasutades üht järgmistest meetoditest.

- Varreosad kaetakse piisava koguse (umbes 40 ml) ekstraktsioonipuhvriga (4. liide) ja segatakse pöörleva lokustil (50–100 pööret minutis) 4 tundi alla 24 °C juures või 16–24 tundi jahutatult.
- Töödeldakse kohe, purustades osad tugevas matseratsioonikotis (näiteks Stomacher või Bioreba) koos sobiva koguse ekstraktsioonipuhvriga (4. liide) kas kummivasara või kohase peenestusseadmega (näiteks Homex). Kui see ei ole võimalik, säilitatakse varreosad jahutatult mitte üle 72 tunni või toatemperatuuril mitte üle 24 tunni.

2.1.3. Kui lahus on seisnud 15 minutit, dekanteeritakse supernatant.

2.1.4. Ekstrakti täiendavat selitamist või bakterifraktsiooni kontsentreerimist tavaliselt ei nõuta, kuid seda võib filtreerida ja/või tsentrifuugida vastavalt III jao punktidele 1.1.3–1.1.5.

2.1.5. Lahjendamata või kontsentreeritud proov jagatakse kahte võrdsesse ossa. Üht osa säilitatakse 4–10 °C juures katsete tegemise ajal ja teist osa 10–25 % (v/v) steriilse glütserooliga temperatuuril – 16 kuni – 24 °C (nädalaid) või – 68 kuni – 86 °C (kuid) juhuks, kui on vaja teha täiendavaid katseid.

2.2. Analüüsimine

Vaata diagramme ja analüüsikirjeldusi ja optimeeritud protokolle vastavates liidetes.

Selektiivne isoleerimine (vt VI jao punkt A.4.)

IF-analüüs (vt VI jao punkt A.5.)

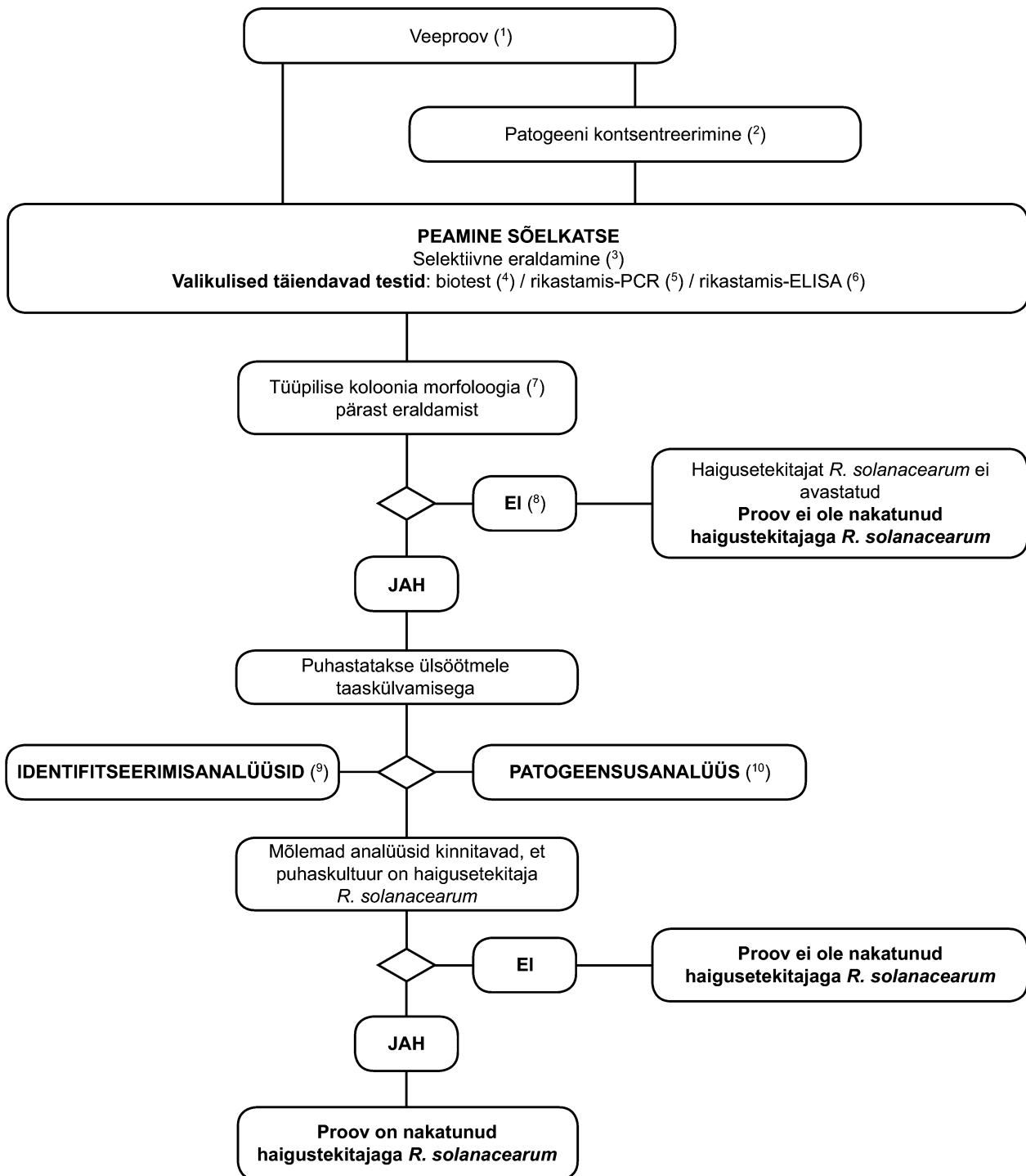
PCR-analüüs (vt VI jao punkt A.6.)

FISH-analüüs (vt VI jao punkt A.7.)

ELISA-analüüs (vt VI jao punkt A.8.)

Biotest (vt VI jao punkt A.9.).

IV JAGU

1. Haigusetekitaja *R. solanacearum* avastamis- ja kindlaksmääramismetoodika vees

- (¹) Soovitav proovivõtumenetlus on IV jao punktis 2.1.
- (²) Patogeeni kontsentreerimismeetodeid kirjeldatakse IV jao punktis 2.1. Kontsentreerimine suurendab nii patogeeni kui ka võistlevate saprofüütbakterite populatsioone ning on soovitatav vaid juhul, kui see ei põhjusta isoleerimisanalüüsi inhibeerimist.
- (³) Selektiivse eraldamise analüüsi kirjeldatakse VI jao punktis A.4.
- (⁴) Biotesti kirjeldatakse VI jao punktis A.9.
- (⁵) PCR rikastamismeetodeid kirjeldatakse VI jao punktis A.4.2 ja VI jao punktis A.6.
- (⁶) ELISA rikastamismeetodeid kirjeldatakse VI jao punktis A.4.2 ja VI jao punktis A.8.
- (⁷) Tüüpilise koloonia morfoloogia kirjeldus esitatakse II jao punkti 3 alapunktis d.
- (⁸) Saprofüütbakterid võivad olla konkurendiks või inhibiitoriks ja selle tõttu võib kasvatamine ebaõnnestuda. Kui tekib kahtlus, et kõrged saprofüütbakterite populatsioonid võivad mõjutada eraldamise usaldusväärsust, korratakse isoleerimisanalüüsi pärast proovi lahjendamist steriilses vees.
- (⁹) Haigusetekitaja *R. solanacearum* eeldatava puhaskultuuri saab usaldusväärselt kindlaks määrata, kasutades VI jao punktis B. kirjeldatud analüüsi.
- (¹⁰) Patogeensusanalüüsi kirjeldatakse VI jao punktis C.

2. Haigusetekitaja *R. solanacearum* avastamis- ja kindlaksmääramismeetodid vees

Põhimõte

Käesolevas jaos kirjeldatud valideeritud avastusmeetodeid kasutatakse patogeeni avastamiseks pinnavee proovides ning seda võib kohaldada ka kartulitöötlemise heitvee ja reovee proovides. Oluline on märkida, et eeldatav avastustundlikkus sõltub substraadist. Isoleerimisanalüüsi tundlikkust mõjutavad võistlevate saprofüütbakterite populatsioonid, mille sisaldus on üldiselt palju suurem kartulitöötlemisheitvees ja reovees kui pinnavees. Allpool esitatud meetodika avastab pinnavees eeldatavalt 10^3 rakku liitri kohta, kartulitöötlemise heitvees ja reovees on tundlikkus tõenäoliselt märgatavalt madalam. Seetõttu on soovitatav analüüsida heit- ja reovett pärast puhastustoiminguid (nt sadestamist ja filtreerimist), mille käigus vähendatakse saprofüütbakterite populatsioone. Negatiivsete tulemuste usaldusväärsuse hindamisel tuleb arvesse võtta analüüsimeetodite tundlikkuspiiranguid. Käesolevat meetodikat on edukalt kasutatud pinnavees patogeeni olemasolu või puudumise kindlakstegemiseks läbi viidaval seirel, kartulitöötlemise heitvee ja reovee seirel tuleb arvestada selle piiratust.

2.1. Proovi ettevalmistamine

Märkus

- Haigusetekitaja *R. solanacearum*'i avastamine pinnavees on kõige usaldusväärsem hiliskevadel, suvel ja sügisel, kui veetemperatuur on üle $15\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Korduv proovivõtt määratud proovivõtukohtades eri aegadel eespool nimetatud perioodil vähendab ilmastikutingimuste mõju ja suurendab avastamise usaldusväärsust.
- Arvesse tuleb võtta tugeva vihmaja ja vooluveekogu geograafia mõju, et vältida patogeeni avastamist segavat ulatuslikku lahjendumist.
- Veeproove tuleb võtta peremeestaimede läheduses, kui need on olemas.

2.1.1. Kõigis valitud proovivõtukohtades võetakse veeproove ühekordse kasutusega steriilsetesse katseklaasidesse või pudelitesse võimaluse korral sügavamalt kui 30 cm ja 2 m raadiuses kaldast. Töötlemisheitvee ja reovee proove võetakse ärajuhtimiskohas. Soovitatav proovisuurus on kuni 500 ml proovivõtukohta kohta. Väiksemate proovide puhul on soovitatav võtta proove proovivõtukohest vähemalt 3 korda, kusjuures iga proov koosneb 2 dubleeritud vähemalt 30 ml suurusest alaproovist. Tõhusaks seireks valitakse vähemalt 3 proovivõtukohta vooluveekogu iga 3 km kohta ning võetakse proove ka vooluveekokku suubuvatest haruveekogudest.

2.1.2. Proove transporditakse jahedas ($4\text{--}10\text{ }^{\circ}\text{C}$) ja pimedas ning analüüsitakse 24 tunni jooksul.

2.1.3. Vajaduse korral võib bakterifraktsiooni kontsentreerida, kasutades üht järgmistest meetoditest.

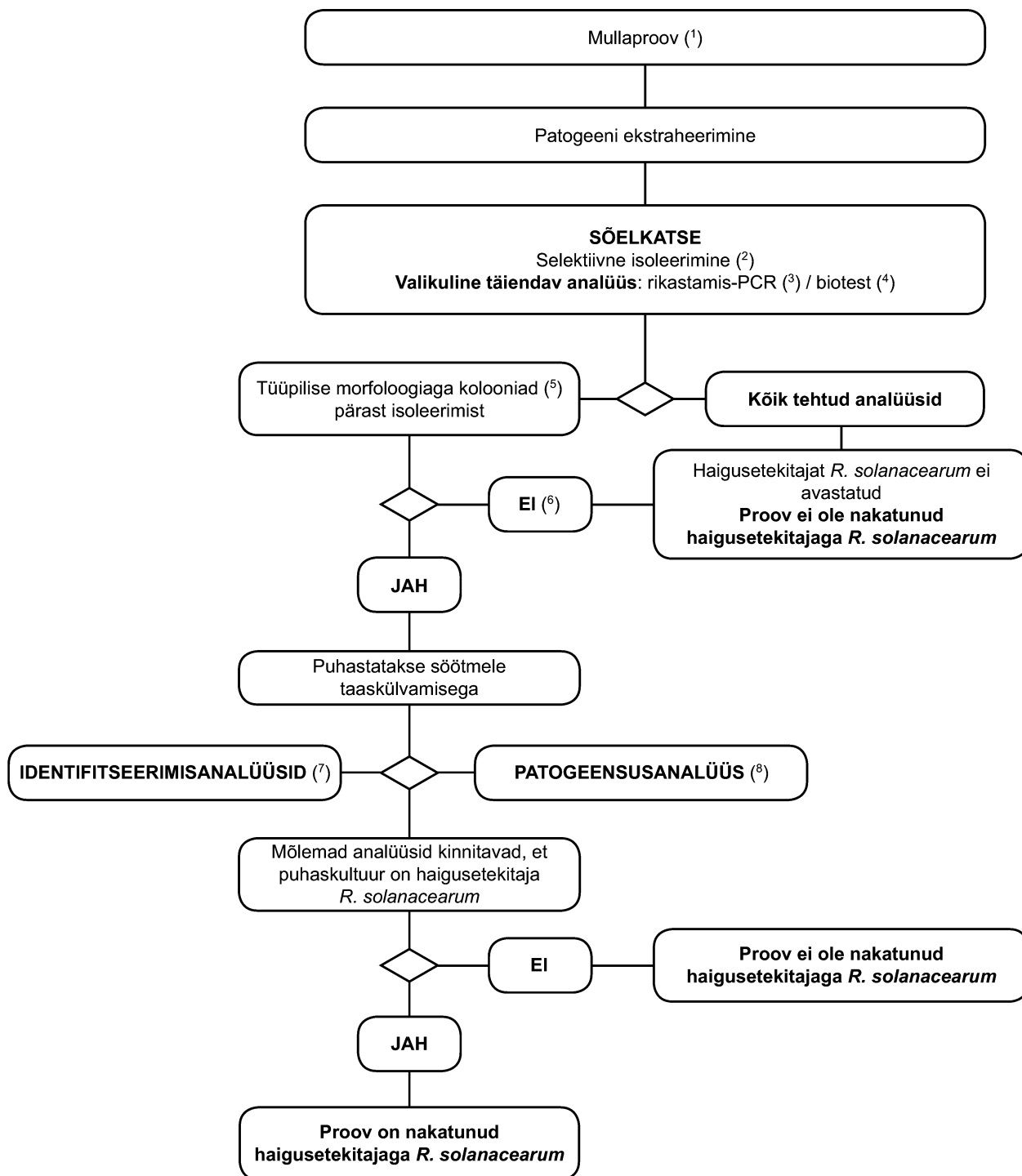
- a) Tsentrifugeeritakse 30–50 ml alaproovi 10 000 g juures 10 minutit (või 7 000 g juures 15 minutit), eelistatavalt temperatuuril $4\text{--}10\text{ }^{\circ}\text{C}$, eemaldatakse supernatant ja bakterisade resuspendeeritakse 1 ml fosfaatpuhvrts (4. liide).
- b) Membraanfiltreerimine (pooride läbimõõt vähemalt $0,45\text{ }\mu\text{m}$), mille järel pestakse filter 5–10 ml fosfaatpuhvrts ja pesuvesi säilitatakse. See meetod on sobiv suurte veekoguste puhul, mis sisaldavad vähe saprofüütbaktereid.

Kontsentreerimine ei ole tavaliselt soovitatav kartulitöötlemise heitvee ja reovee proovide puhul, sest võistlevate saprofüütbakterite suurenenud populatsioonid inhibeerivad *Ralstonia solanacearum*'i avastamist.

2.2. Analüüsimine

Vaata diagrammi ja analüüsikirjeldusi vastavates liidetes.

V JAGU

1. Haigusetekitaja *R. solanacearum* avastamis- ja kindlaksmääramismetoodika mullas

- (¹) Soovitav proovivõtumenetlus on V jao punktis 2.1.
- (²) Selektiivse isoleerimise analüüsi kirjeldatakse VI jao punktis A.4.
- (³) PCR rikastamismeetodeid kirjeldatakse VI jao punktis A.4.2 ja VI jao punktis A.6.
- (⁴) Biotesti kirjeldatakse VI jao punktis A.9.
- (⁵) Tüüpilise koloonia morfoloogia kirjeldus esitatakse II jao punkti 3 alapunktis d.
- (⁶) Saprofüütbakterid võivad olla konkurendiks või inhibiitoriks ja selle tõttu võib kasvatamine ebaõnnestuda. Kui tekib kahtlus, et kõrged saprofüütbakterite populatsioonid võivad mõjutada isoleerimise usaldusväärsust, korraldatakse isoleerimisanalüüsi pärast proovi edasist lahendamist.
- (⁷) Haigusetekiitaja *R. solanacearum* eeldatava puhaskultuuri saab usaldusväärselt kindlaks määrata, kasutades VI jao punktis B. kirjeldatud analüüsi.
- (⁸) Patogeensusanalüüsi kirjeldatakse VI jao punktis C.

2. Haigusetekitaja *R. solanacearum* avastamis- ja kindlaksmääramismeetodid mullas

Põhimõtted

Käesolevas jaos kirjeldatud valideeritud avastusmeetodeid kohaldatakse patogeeni avastamiseks mullaproovides, kuid seda võib kasutada ka kartuli tahkete töötlemisjäätmete või reoveesetete proovides. Tuleb siiski märkida, et need meetodid ei ole piisavalt tundlikud, et tagada haigusetekitaja *Ralstonia solanacearum* madalate ja/või ebaühtlaselt hajunud populatsioonide avastamine, mis võivad esineda nende substraatide loomulikult saastunud proovides.

Negatiivsete tulemuste usaldusväärsuse hindamisel ja seire käigus patogeeni olemasolu või puudumise kindlakstegemisel mullas või settes tuleb arvesse võtta käesoleva meetoodika piiratud tundlikkust. Kõige usaldusväärsem analüüs patogeeni olemasolu kindlakstegemiseks põllumullas on vastuvõtliku peremeestaime istutamine ja selle nakatumise jälgimine, ent isegi selle meetodiga ei avastata madalat nakkustaset.

2.1. Proovi ettevalmistamine

2.1.1. Põllumullaproovide võtmisel tuleks järgida nematoodiproovi võtmise üldpõhimõtteid. Kogutakse 0,5–1 kg mulda proovi kohta 60 kohast 0,3 ha kohta 10–20 cm sügavuselt (või võrgustikul 7 × 7 meetrit). Kui kahtlustatakse patogeeni olemasolu, suurendatakse kogumiskohtade arvu 120ni 0,3 ha kohta. Enne analüüsimist hoitakse proove temperatuuril 12–15 °C. Kartuli töötlemis- ja reoveesetete proove võetakse kokku 1 kg kohtadest, mis esindavad analüüsitavate setete kogumahtu. Iga proov segatakse enne analüüsimist hoolikalt.

2.1.2. 10–25grammised mulla või sette alaproovid disperseeritakse pöörleval loksutil (250 pööret minutis) kuni 2 tundi 60–150 milliliitris ekstraktsioonipuhvris (4. liide). 0,02 % Tween-20 ja 10–20 grammi steriilse kruusa lisamine võib vajaduse korral dispersiooni hõlbustada.

2.1.3. Analüüsimise ajal hoida suspensiooni temperatuuril 4 °C.

2.2. Analüüsimine

Vaata diagrammi ja analüüsi kirjeldusi vastavates liidetes.

VI JAGU

HAIGUSETEKITAJA *R. SOLANACEARUM* AVASTAMISE JA KINDLAKSMÄÄRAMISE OPTIMEERITUD PROTOKOLLID

A. DIAGNOSTILISED JA AVASTAMISANALÜÜSID

1. Varrelima test

Haigusetekitaja *R. solanacearum* olemasolu närbuvates kartuli-, tomati- ja teiste peremeestaime vartes saab määrata järgmise lihtsa eelanalüüsiga. Taimevars lõigatakse läbi kohe ülalpool mullapinda. Lõikepind suspendeeritakse puhta veega katseklaasis. Jälgitakse iseloomulikke bakterilima niitide iseeneslikku eritumist lõigatud juhtkimpudest mõne minuti pärast.

2. Polü-β-hüdroksübutüraadi graanulite tuvastamine

1. Mikroskoobi objektiklaasil valmistatakse äie YPGA- või SPA-söötmel (2. liide) kasvatatud nakatunud koe või 48tunnise kultuuri bakterilimast.

2. Valmistatakse positiivsed kontrolläiged haigusetekitaja *R. solanacearum*'i biotüübi 2 tüvega ning vajaduse korral negatiivne kontrolläie teadaoleva PHB negatiivse liigiga.

3. Lastakse kuivada õhu käes ja klaaside alumine pool tõmmatakse kiiresti läbi leegi, et äie fikseeruks.

4. Preparaat värvitakse kas Niluse sinisega või Sudaani mustaga ning vaadeldakse mikroskoobis järgmiselt.

Värvimine Niiluse sinisega

- a) Klaasid ujutatakse üle Niiluse sinise A 1 % vesilahusega ja inkubeeritakse 10 minutit 55 °C juures.
- b) Värvilahus valatakse pealt ära. Loputatakse korraks tasaselt voolava kraanivee all. Liigne vesi eemaldatakse kuivatuspaberiga.
- c) Äie ujutatakse üle äädikhappe 8 % vesilahusega ja inkubeeritakse 1 minut toatemperatuuril.
- d) Loputatakse korraks tasaselt voolava kraanivee all. Liigne vesi eemaldatakse kuivatuspaberiga.
- e) Niisutatakse uuesti veetilgaga ja asetatakse peale katteklaas.
- f) Värvitud äiet vaadeldakse mikroskoobis, millele on sobitatud epifluorestsentsvalgusallikas, 450 nm juures ning kasutatakse õliimmersiooni 600–1 000kordsel suurendusel ja õli- või veeimmersiooni objektiivi.
- g) Vaadeldakse ereoranžilt fluorestseeruvaid PHB graanuleid. Vaadeldakse ka altvalgusega valgusmikroskoobis, et olla kindel, et graanulid on rakusised ning et rakumorfoloogia on *R. solanacearum*'i bakterirakkudele tüüpiline.

Värvimine Sudaani mustaga

- a) Klaasid ujutatakse üle Sudaani musta 0,3 % lahusega 70 % etanoolis ja inkubeeritakse 10 minutit toatemperatuuril.
- b) Värvilahus valatakse pealt ära ning loputatakse korraks kraanivee all, eemaldades liigse vee kuivatuspaberiga.
- c) Klaasid kastetakse lühikeseks ajaks ksülooli ja kuivatatakse kuivatuspaberiga. *Ettevaatust: ksülool on ohtlik aine, tuleb rakendada vajalikke ettevaatusabinõusid ja töötada tõmbekapis*
- d) Klaasid ujutatakse üle 0,5 % (mass/maht) safraniini vesilahusega ja jäetakse 10 sekundiks toatemperatuuril seisma. *Ettevaatust: safraniin on ohtlik aine, tuleb rakendada vajalikke ettevaatusabinõusid ja töötada tõmbekapis.*
- e) Pestakse tasaselt voolava kraanivee all, kuivatatakse kuivatuspaberiga ning asetatakse peale katteklaas.
- f) Värvitud äieid vaadeldakse valgusmikroskoobis, millele on ülekantud valgus, ja kasutatakse õliimmersiooni 1 000kordsel suurendusel ja õliimmersiooni objektiivi.
- g) Vaadeldakse kahvatupunaseks värvunud rakuseintega *R. solanacearum*'i rakkudes esinevaid sinakasmusta värvusega PHB graanuleid.

3. Seroloogiline aglutinatsiooni analüüs

R. solanacearum'i rakkude aglutinatsioon bakterilimas või sümptomaatilise koe ekstraktides on kõige paremini jälgitav valideeritud antikehi kasutades (vt 3. liide), mis on konjugeeritud asjakohaste värviliste märgistusainetega, nagu punased *Staphylococcus aureus*'e rakud või värvilised lateksiosakesed. Müügil olevaid komplekte kasutades (vt 3. liide) järgitakse tootja kasutamish juhendeid. Muul juhul toimitakse järgnevalt:

- a) konjugeeritud antikehasuspensiooni ja bakterilima tilgad (ligikaudu 5 µl kumbagi) segatakse mitmeaknaliste objektklaaside aknaväljades;
- b) valmistatakse positiivsed ja negatiivsed kontrollproovid, kasutades *R. solanacearum*'i biotiüübi 2 suspensioone ja heteroloogset tüve;
- c) pärast 15 sekundit õrna segamist jälgitakse aglutinatsiooni positiivsetes proovides.

4. Selektiivne isoleerimine

4.1. Selektiivsöötmele väljakülvamine

Märkus: enne selle meetodi esmakordset kasutamist tehakse eelanalüüsid, et tagada milliliitri kohta *R. solanacearum*'i 10^3 kuni 10^4 kolooniaid moodustavate osakeste taasavastamine, lisatuna varem negatiivsena analüüsitud proovide ekstraktidele.

Kasutatakse nõuetekohaselt valideeritud selektiivsöötmeid, nagu SMSA (muudetud Elphinstone *et al.*, 1996; vt 2. liide).

Suurt tähelepanu nõuab haigusetikitaja *R. solanacearum* eristamine teistest bakteritest, mille kolooniad võivad kasvusöötmele areneda. Kui söötmeplaadid on bakteritega üleasustatud või leidub antagonistlike baktereid, võib *R. solanacearum*'i kolooniatel esineda ebatüüpilist morfoloogiat. Võistlevate või antagonistlike bakterite mõju kahtluse korral tuleks proovi uuesti analüüsida, kasutades erinevat analüüsi.

See meetod on kõige tundlikum värske prooviekstraktide kasutamisel. Meetodit saab siiski kasutada ka ekstraktidega, mida on säilitatud glütserooli all temperatuuril -68 kuni -86 °C.

Positiivseteks kontrollproovideks valmistatakse kümnekordne lahjendus virulentse *Ralstonia solanacearum*'i biotüübi 2 suspensioonist, mille sisaldus on 10^6 kolooniaid moodustavat rakku milliliitri kohta (nt NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857). Igasuguse saastumise vältimiseks valmistatakse positiivsed kontrollproovid analüüsitavaatest proovidest täiesti eraldi.

Iga uuesti valmistatud selektiivsöötme partii kõlblikkust patogeeni kasvatamiseks tuleks enne tavaproovide analüüsimist kontrollida.

Kontrollproove analüüsitakse samamoodi kui analüüsitavaid proovi (analüüsitavaid proove).

4.1.1. Analüüsi läbiviimiseks tehakse uuritava proovi lahjenduste väljakülv söötmeplaatidele tagamaks, et saprofüütbakterite kolooniaid moodustavad populatsioonid on välja lahjendatud. Söötmeplaadile külvatakse 50–100 µl prooviekstrakti ja igat lahjendust.

4.1.2. Söötmeplaate inkubeeritakse temperatuuril 28 °C. Tulemused loetakse 48 tunni pärast ja seejärel iga päev kuni 6 päeva jooksul. Tüüpilised *R. solanacearum*'i kolooniad SMSA-söötmele on piimjasvalged, lamedad, ebaühtlase kujuga ja fluidaalsed ning pärast kolmepäevast inkubeerimist on nende värv keskel roosast veripunase, keskosas iseloomulike spiraalsete keerdudega. (vt veebileht <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Märkus: mõnikord tekivad sellel söötmele *R. solanacearum*'i ebatüüpilised kolooniad. Need võivad olla väikesed, ümmargused, täiesti punast värvi ning mittefluidaalsed või vaid osaliselt fluidaalsed, mistõttu on neid raske eristada saprofüütbakterite kolooniatest.

4.1.3. Eeldatavad *R. solanacearum*'i kolooniad puhastatakse pärast joonkülv või lahjenduse laialikülvamist üldsöötmele, et saada isoleeritud kolooniad (vt 2. liide).

4.1.4. Kultuure säilitatakse lühikest aega steriilses vees (pH 6–8, kloorivaba) toatemperatuuril ja pimedas või pikemat aega krioprotektantses keskkonnas temperatuuril -68 kuni -86 °C või need lüofiliseeritakse.

4.1.5. Määratakse kindlaks eeldatavad kultuurid (vt VI jao punkt B) ja tehakse patogeensusanalüüs (vt VI jao punkt C).

Selektiivsöötme analüüsi tulemuste tõlgendamine

Selektiivsöötme analüüsi tulemus on negatiivne, kui pärast kuuepäevast inkubeerimist ei ole kasvanud ühtki bakterikolooniat või kui ei ole isoleeritud tüüpilisi *R. solanacearum*'i kolooniaid, tingimusel et teised võistlevad või antagonistlikud bakterikolooniad ei pärsi *R. solanacearum*'i kasvu ning et tüüpilised *R. solanacearum*'i kolooniad on kasvanud vaid positiivsetel kontrollplaatidel.

Selektiivsöötme analüüsi tulemus on positiivne, kui eraldatakse eeldatavad *R. solanacearum*'i kolooniad.

4.2. Rikastamismenetlus

Kasutatakse valideeritud rikastussöödet, näiteks Wilbrinki puljongit (vt 2.liide).

Seda menetlust võib kasutada *R. solanacearum*'i kolooniate valikuliseks suurendamiseks prooviekstraktides ja avastustundlikkuse tõstmiseks. Samuti lahjendab see menetlus tõhusalt PCR-reaktsiooni inhibiitoreid (1:100). Tuleb siiski märkida, et *R. solanacearum*'i rikastamine võib ebaõnnestuda sageli samaaegselt rikastatud saprofüütsete organismide võistlemise või antagonistismi tõttu. Seejärel võib olla raske *R. solanacearum*'i isoleerimine rikastuspuljongi kultuuridest. Lisaks on ELISA-analüüsides puhul soovitatav kasutada pigem mono- kui polüklonaalseid antikehi, sest seroloogiliselt seotud saprofüütbakterite populatsioonid võivad suurenedada.

- 4.2.1. Rikastamis-PCRi tarvis pannakse 100 µl prooviekstrakti 10 ml rikastuspuljongisse (2. liide), mille alikvoot on DNA-vabas katseklaasis või kolvis. Rikastamis-ELISA tarvis võib kasutada prooviekstrakti suuremat sisaldust (nt 100 µl ekstrakti 1,0 ml rikastuspuljongis).
- 4.2.2. Inkubeeritakse 27–30 °C juures 72 tundi loksutatava või staatilise kultuurina, kusjuures kork on lõdvalt peal, et tagada õhu juurdepääs.
- 4.2.3. Enne ELISA- või PCR-analüüsi tegemist segatakse hästi.
- 4.2.4. Rikastuspuljongit käsitatakse samamoodi kui proove eeltoodud analüüsid.

Märkus: kui teatavate võistlevate saprofüütbakterite suurte populatsioonide tõttu võib eeldada *R. solanacearum*'i rikastamise inhibitsiooni, võib paremaid tulemusi anda prooviekstraktide rikastamine enne tsentrifuugimist või muid kontsentreerimisetappe.

5. IF-analüüs

Põhimõte

IF-analüüsi tegemist peamise sõelkatsena soovitatakse sellepärast, et see annab stabiilseid tulemusi nõutavate piirväärtuste raames.

Kui peamise sõelkatsena kasutatakse IF-analüüsi ja IF tulemus on positiivne, tuleb teise sõelkatsena teha PCR- või FISH-analüüs. Kui IF-analüüsi kasutatakse teise sõelkatsena ja IF tulemus on positiivne, tuleb analüüsi lõpule viimiseks teha vastavalt diagrammile täiendavaid analüüse.

Märkus: kasutatakse *R. solanacearum*'i antikehade valideeritud allikat (vt veebileht <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). On soovitatav määrata iga uue antikehahapartii tiiter. Tiiter on kõrgeima kontsentratsiooniga lahus, mille juures toimub optimaalne reaktsioon, kui tehakse analüüsi suspensiooniga, mis sisaldab 10⁵ kuni 10⁶ bakteri *R. solanacearum* 2 000. Analüüside käigus tuleks kasutada antikehade töölahuseid, mis on tiitri lähedal või sellega võrdsed.

Analüüs tuleks teha värskest tehtud prooviekstraktidega. Vajaduse korral saab seda edukalt teha ekstraktidega, mida on säilitatud – 68 kuni – 86 °C juures glütserooli all. Glütserooli saab proovist eemaldada nii, et lisatakse 1 ml bakterisademe puhvrit (4. liide), tsentrifuugitakse uuesti 15 minutit 7 000 g juures ja resuspendeeritakse bakterisademe puhvriga võrdesse mahtu. Seda ei ole tihti tarvis, eriti siis, kui proovid kinnitatakse objektiklaasidele leekmeetodil.

Tehakse vastavalt liitele 3B kartuliekstraktis ja soovi korral puhvris suspendeeritud bakteri *R. solanacearum* homologse tüve või mis tahes muu referenttüve eraldi positiivsed kontrollobjektiklaasid.

Võimaluse korral tuleks kasutada looduslikult nakatunud kude (mida on säilitatud lüofiliseerituna või külmutatuna – 16 kuni – 24 °C juures) samalaadseks kontrolliks samal objektiklaasil.

Negatiivse kontrollina võib kasutada varem bakteri *R. solanacearum* negatiivse tulemuse andnud proovi alikvoote.

Positiivseid ja negatiivseid standardiseeritud kontrollaineid, mida saab kasutada nende analüüside puhul, on loetletud 3. liites.

Kasutatakse mitmeaknalisi mikroskoobi alusklase, millel on eelistatult kümme vähemalt 6 mm läbimõõduga aknavälja.

Kontrollproove analüüsitakse samamoodi kui analüüsitavat proovi (analüüsitavaid proove).

- 5.1. Valmistatakse ette objektiklaasid, kasutades üht järgmistest meetoditest.

- i) Bakterisademe puhul, mille tärglisesade on suhteliselt väike:

pipetitakse standardne kogus (6 mm diameetriga aknavälja jaoks on piisav kogus 15 µl, suuremate aknaväljade puhul suurendatakse kogust) 1/100 uuesti suspendeeritud kartulisadet esimesele aknale. Seejärel pipetitakse samasugune kogus lahustamata bakterisadet (1/1) rea ülejäänud akendele. Teist rida võib kasutada duplikaadina või teise proovi jaoks, nagu on näidatud joonisel 1.

ii) Muude bakterisademete korral:

valmistatakse uuesti suspendeeritud bakterisademest kümnekordsed lahjendused (1/10 ja 1/100) sademepuhvrise. Pipetitakse sobiv kogus (6 mm diameetriga aknavälja jaoks on piisav kogus 15 µl, suuremate aknaväljade puhul suurendatakse kogust) uuesti suspendeeritud bakterisadet ja iga lahjendust aknaväljade reale. Teist rida võib kasutada duplikaadina või teise proovi jaoks, nagu on näidatud joonisel 2.

- 5.2. Piisad kuivatatakse ümbritseva õhu temperatuuril või neid soojendades temperatuurini 40–45 °C. Bakterirakud kinnitatakse objektiklaasile kuumutades (15 minutit 60 °C juures), leekmeetodil, 95 % etanooliga või vastavalt antikehade tarnijate konkreetsetele juhisteile.

Vajaduse korral võib kinnitatud objektiklaase säilitada külmutatult kuivatusainet sisaldavas karbis võimalikult vähe aega (kuni kolm kuud) enne järgmist analüüsi.

5.3. IF-meetod

i) Vastavalt punkti 5.1 alapunktis i kirjeldatud objektiklaasi valmistamisele

Valmistatakse rida kahekordseid lahjendusi. Esimeses augus peaks olema 1/2 tiitrist (T/2), teistes 1/4 tiitrist (T/4), 1/2 tiitrist (T/2), tiiter (T) ja kahekordne tiiter (2T).

ii) Vastavalt punkti 5.1 alapunktis ii kirjeldatud objektiklaasi valmistamisele

Valmistatakse antikehade töölahjendus IF-puhvrise. Töölahjendus mõjutab spetsiifilisust. Joonis 1. Analüüsi objektiklaaside valmistamine vastavalt punkti 5.1

Joonis 1. Alapunktile i ja punkti 5.3 alapunktile i.

		Uuesti suspendeeritud bakterisademe lahjendused					
		1/100	1/1	1/1	1/1	1/1	<input type="checkbox"/> Uuesti suspendeeritud bakterisademe lahjendus
(T = tiiter)		T/2	T/4	T/2	T	2T	<input type="checkbox"/> Antiseerumi/antikehade kahekordsed lahjendused
Proov 1		● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Proovi 1 duplikaat või proov 2		● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

Joonis 2. Analüüsi objektiklaaside valmistamine vastavalt punkti 5.1 alapunktile ii ja punkti 5.3 alapunktile ii.

		Antiseerumi/antikehade töölahused					
		1/1	1/10	1/100	tühi	tühi	<input type="checkbox"/> Uuesti suspendeeritud bakterisademe kümnelahjendused
Proov 1		● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Proovi 1 duplikaat või proov 2		● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

- 5.3.1. Objektiklaasid asetatakse niiskele kuivatuspaberile. Iga aknaväli kaetakse täielikult antikehade lahendus(t)ega. Igale aknaväljale lisatud antikehade kogus peab olema vähemalt võrdne objektiklaasile lisatud ekstrakti kogusega.

Kui antikehade tarnijalt ei ole konkreetseid juhiseid, tuleks kasutada järgmist meetodit.

- 5.3.2. Objektiklaase inkubeeritakse niiskel paberil katte all 30 minutit ümbritseva õhu temperatuuril (18–25 °C).
- 5.3.3. Igalt objektiklaasilt raputatakse piisad ära ja need loputatakse hoolikalt IF-puhvriga. Pestakse 5 minutit IF Tween-puhvril (4. liide) ning seejärel IF-puhvril. Tuleks vältida aerosoolide ja piiskade ülakandumist, mis võiks põhjustada ristsaastumise. Kuivatuspaberiga kergelt kuivatades eemaldatakse ettevaatlikult liigne niiskus.
- 5.3.4. Objektiklaasid asetatakse niiskele paberile. Aknaväljad kaetakse FITC-konjugaadi lahendusega, mida kasutati tiitri määramisel. Aknaväljadele lisatud konjugaadi kogus peab olema sama, mis on antikehade kogus.
- 5.3.5. Objektiklaase inkubeeritakse niiskel paberil katte all 30 minutit ümbritseva õhu temperatuuril (18–25 °C).
- 5.3.6. Konjugaadi tilgad raputatakse objektiklaasilt maha. Loputatakse ja pestakse nagu eespool kirjeldatud (5.3.3).

Ettevaatlikult eemaldatakse liigne niiskus.

- 5.3.7. Igasse aknavälja pipetatakse 5–10 µl 0,1 M fosfaatpuhverdatud glütserooli (4. liide) või kaubanduslikult kättesaadavat pleekimisvastast kattevedelikku ning objektiklaas kaetakse katteklasaasiga.

5.4. IF-analüüsi tulemused

- 5.4.1. Objektiklaase vaadeldakse mikroskoobis, millele on paigaldatud epifluorestsentsvalgusallikas ja sobilikud filtrid tööks FITCga, ning kasutatakse õli- või vesimmersiooni suurendusel 500–1 000 korda. Aknavälju vaadeldakse risti läbi kahe diameetri täisnurga suhtes ja ümber aknavälja välisääre. Proovide puhul, kus ei paista üldse või paistab ainult väga vähe rakke, vaadeldakse vähemalt 40 mikroskoobi vaatevälja.

Esialgu kontrollitakse positiivse tulemusega kontroll-objektiklaasi. Rakud peavad säravalt fluorestseeruma ja olema täielikult värvunud kindlaksmääratud antikehade tiitris või töölahjenduses. Kui fluorestseerumine ei ole täielik, tuleb IF-analüüsi (VI jao punkt A.5) korrata.

- 5.4.2. Vaadeldakse bakteri *R. solanacearum* iseloomuliku morfoloogiaga säravalt fluorestseeruvaid rakke objektiklaaside aknaväljades (vt veebileht <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Fluorestseerumise intensiivsus peaks olema ekvivalentne positiivse kontrolltüve omaga sama antikeha lahjenduse juures. Lõplikult värvumata või nõrgalt fluorestseeruvad rakud jäetakse kõrvale.

Mis tahes saastumiskahtluse korral tuleb analüüsi korrata. Näiteks siis, kui partii kõigil objektiklaasidel on positiivseid rakke puhvri saastumise tõttu või kui leitakse positiivseid rakke objektiklaasi pinnal (väljaspool aknavälju).

- 5.4.3. Immunofluorestsentsanalüüsi spetsiifilisuse tõttu on mitmeid probleeme. Kartuli basaalse tipusüdamiku ja varre sademetes ilmuvad tõenäoliselt ebatüüpilise morfoloogiaga fluorestseerivate rakkude taustpopulatsioonid ning bakteriga *R. solanacearum* sarnase suuruse ja morfoloogiaga ristuvalt reageerivad saprofüütbakterid.
- 5.4.4. Arvesse võetakse ainult tüüpilise suuruse ja morfoloogiaga fluorestseeruvaid rakke punktis 5.3 esitatud antikehade tiitris või töölahjenduses.

5.4.5. IF-tulemuste tõlgendamine

- i) Kui objektiklaasi aknaväljal esineb morfoloogiliselt tüüpilisi eredalt fluorestseeruvaid rakke, määratakse keskmine rakkude arv mikroskoobi vaatevälja kohta ja arvutatakse tüüpiliste rakkude arv milliliitris uuesti suspendeeritud bakterisademes (5. liide).

Proovi IF-tulemus on positiivne, kui seal on vähemalt 5×10^3 tüüpilist rakku uuesti suspendeeritud bakterisademe milliliitris. Proovi loetakse saastumiskahtlusega prooviks ning tuleb teha lisaanalüüse.

- ii) Proovi IF-tulemus on negatiivne, kui seal on alla 5×10^3 rakku uuesti suspendeeritud bakterisademe milliliitris, ning proov loetakse negatiivseks. Lisaanalüüse ei ole vaja teha.

6. PCR-analüüs

Põhimõtted

Kui peamise sõelkatsena kasutatakse PCR-analüüsi ja tulemus on positiivne, tuleb teise kohustusliku sõelkatsena teha isolatsiooni- või IF-analüüs. Kui PCR-analüüsi kasutatakse teise sõelkatsena ja tulemus on positiivne, tuleb lõpliku diagnoosi panemiseks teha vastavalt diagrammile täiendavaid analüüse.

Selle meetodi kasutamist peamise sõelkatsena soovitatakse ainult siis, kui on olemas eriteadmised.

Märkus: eelanalüüsid sellel meetodil peaksid võimaldama taasavastada 10^3 kuni 10^4 bakteri *R. solanacearum* rakku milliliitris lisatuna varem negatiivse tulemuse andnud prooviekstraktidele. Maksimaalse tundlikkuse ja spetsiifilisuse saavutamiseks kõigis laborites võib olla vajalik teha optimeerimisanalüüse.

Kasutatakse nõuetekohaselt valideeritud PCR-reaktiive ja protokolle (vt 6. liide). Eelistatavalt valitakse sisekontrolliga meetod.

Proovi sihtmärgi DNAGA saastumise vältimiseks kasutatakse kohaseid ettevaatusabinõusid. PCR-analüüsi peaksid tegema kogenud tehnikud spetsiaalsetes molekulaarbioloogia laborites, et minimeerida sihtmärgi DNAGA saastumise võimalust.

DNA ekstraheerimise ja PCR-menetluse negatiivseid kontrole tuleks alati käsitleda menetluses viimaste proovidenäna, et näidata, kas on toimunud DNA ülekandmist.

PCR-analüüsi tuleks kaasata järgmised negatiivsed kontrollid:

- prooviekstrakt, mis andis varem bakteri *R. solanacearum* osas negatiivse tulemuse,
- kontrollpuhvrid, mida kasutati bakterite ja DNA eraldamisel proovist,
- PCR-reaktsioonisegu.

Tuleks kaasata järgmised positiivsed kontrollid:

- resuspendeeritud bakterisegude alikvoodid, millele on lisatud bakterit *R. solanacearum* (valmistamist vt liites 3 B),
- bakteri *R. solanacearum* virulentse isolaadi (näiteks NCPBP 4156 või PD 2762 või CFBP 3857) vesisuspensioon (10^6 rakku milliliitris) (vt liide 3 B),
- võimaluse korral kasutatakse PCR-analüüsis ka positiivsetest kontrollproovidest saadud DNAd.

Võimaliku saastumise vältimiseks valmistatakse positiivsed kontrollid analüüsitavatest proovidest eraldi keskkonnas.

Prooviekstraktid peaksid olema võimalikult mullavabad. Seepärast on teatavatel juhtudel soovitatav valmistada ekstraktid pestud kartulitest, kui soovitakse kasutada PCR-protokolle.

Positiivsed ja negatiivsed standardiseeritud kontrollained, mida saab kasutada nende analüüside puhul, on loetletud 3. liites.

6.1. DNA puhastamise meetodid

Kasutatakse eespool kirjeldatud positiivseid ja negatiivseid kontrollproove (vt 3. liide).

Kontrollproove analüüsitakse samamoodi kui proovi (proove).

Sihtmärgi DNA eraldamiseks komplekssetest prooviainetest on võimalik kasutada erinevaid meetodeid, mille käigus eemaldatakse PCRi inhibiitorid ja muud ensümaatilised reaktsioonid ning kontsentreeritakse prooviekstraktis sihtmärgi DNA. Järgmiseid meetodeid on optimeeritud 6. liites esitatud valideeritud PCR-meetoditega kasutamiseks.

a) Pastroki (2000) meetod

- 1) Pipetatakse 220 µl lüüsipuhvrit (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) 1,5 ml Eppendorfi topsi.
- 2) Lisatakse 100 µl prooviekstrakti ja pannakse 10 minutiks kuumutusplokile või vesivanni 95 °C juures.
- 3) Tops pannakse 5 minutiks jääle.
- 4) Lisatakse 80 µl lüüsiühendi põhilahust (50 mg lüüsiühendi ml kohta 10 mM Tris HCl, pH 8,0) ja inkubeeritakse 30 minutit 37 °C juures.
- 5) Lisatakse 220 µl Easy DNA[®] lahust A (Invitrogen), segatakse hästi segistil ja inkubeeritakse 30 minutit 65 °C juures.
- 6) Lisatakse 100 µl Easy DNA[®] lahust B (Invitrogen), segatakse tugevalt, kuni sade valgub topsis vabalt ja proov on ühtlaselt viskoosne.
- 7) Lisatakse 500 µl kloroformi ja segatakse segistil viskoossuse kadumiseni ja homogeense segu saamiseni.
- 8) Faaside eraldamiseks ja interfaasi moodustamiseks tsentrifuugitakse 15 000 g juures 20 minutit temperatuuril 4 °C.
- 9) Ülemine faas kantakse üle puhtasse Eppendorfi topsi.
- 10) Lisatakse 1 ml 100 % etanooli (– 20 °C), segatakse lühidalt ja inkubeeritakse jääl 10 minutit.
- 11) Tsentrifugeeritakse 20 minutit 15 000 g juures temperatuuril 4 °C ja eemaldatakse etanool bakterisademest.
- 12) Lisatakse 500 µl 80 % etanooli (– 20 °C) ja segatakse, pöörates topsi põhjaga ülespoole.
- 13) Tsentrifugeeritakse 10 minutit 15 000 g juures temperatuuril 4 °C, bakterisade hoitakse alles ja eemaldatakse etanool.
- 14) Bakterisademel lastakse kuivada õhu käes või seadmes DNA Speed Vac.
- 15) Bakterisade resuspendeeritakse 100 µl steriilses ultrapuhtas vees ja jäetakse toatemperatuuril seisma vähemalt 20 minutiks.
- 16) Säilitatakse – 20 °C juures kuni PCR-analüüsi tegemiseni.
- 17) Igasugune valge sade tsentrifuugitakse alla ja kasutatakse 5 µl supernatanti, mis sisaldab DNAd PCR-analüüsi tarvis.

b) Muud meetodid

Võib kasutada muid DNA eraldamise meetodeid (näiteks Qiagen DNeasy Plant Kit), eeldusel et need sama tõhusalt puhastavad välja DNA kontrollproovidest, mis sisaldavad 10^3 kuni 10^4 patogeeni rakku milliliitris.

6.2. PCR-analüüs

- 6.2.1. Valmistatakse ette PCR-analüüsi analüüsi- ja kontrollmatriisid vastavalt valideeritud protokollile (VI jao punkt A.6). Valmistatakse proovi DNA ekstrakti üks kümnendlahjendus (1:10 ultrapuhtas vees).
- 6.2.2. Saastevabas keskkonnas valmistatakse kohane PCR-reaktsioonisegu vastavalt avaldatud protokollile (6. liide). Võimaluse korral soovitatakse kasutada mitmekordseid PCR-protokolle sisemise PCR-kontrolliga.
- 6.2.3. Lisatakse 2–5 µl DNA ekstrakti 25 µl PCR-reaktsioonisegu kohta steriilsetes PCR-katseklaasides vastavalt PCR-protokollidele (vt 6. liide).
- 6.2.4. Võetakse ainult PCR-reaktsioonisegu sisaldav negatiivne kontrolliproov ja proovi kohta lisatakse sama ultrapuhta vee allikat, mida kasutati PCR-segus.
- 6.2.5. Katseklaasid pannakse samasse termotsüklerisse, mida kasutati eelanalüüsi tegemisel, ning see pannakse tööle kohaselt optimeeritud PCR-programmis (6. liide).

6.3. PCR-produkti analüüs

- 6.3.1. PCR-amplikonid eraldatakse agarosgeelektroforeesi teel. Võetakse igast proovist vähemalt 12 µl paljundatud DNA reaktsioonisegu, mis on segatud 3 µl täitepuhvriga (6. liide) 2,0 %lises agarosgeelis trisatsetaat-EDTA (TAE) puhvris (6. liide) 5-8 V/cm. Kasutatakse kohast DNA markerit, näiteks 100 aluspaari.
- 6.3.2. DNA ribad tuuakse esile, värvides neid eetumbromiidiga (0,5 mg liitris) 30–60 minutit, võttes kohaseid ettevaatusabinõusid selle mutageeni käitlemisel.
- 6.3.3. Värvunud geeli vaadeldakse lühilaine ultraviolet valgustusallikaga ($\lambda = 302$ nm) oodatava suurusega amplifitseerunud PCR-produktide (6. liide) leidmiseks ja need dokumenteeritakse.
- 6.3.4. Kõigi uute leidude/juhtumite korral tõendatakse PCR-amplikoni usaldatavust ülejäänud amplifitseeritud DNA proovi restriksiooniensüümi analüüsiga, inkubeerides optimaalsel temperatuuril ja optimaalse aja jooksul kohase ensüümi ja puhvriga (vt 6. liide). Lahustunud fragmendid eraldatakse elektroforeesil agarosgeelis nagu varem ja vaadeldakse pärast värvimist eetumbromiidiga ultraviolet valgustusallikaga iseloomulikke restriksioonifragmendi pilti ning võrreldakse seda lahustamata ja lahustunud positiivse kontrolliga.

PCR-analüüsi tulemuse tõlgendamine

PCR-analüüs on negatiivne, kui kõnealus proovis ei avastata bakterile *R. solanacearum* spetsiifilist PCR-amplikoni, kuid see avastatakse kõigis positiivse kontrolli proovides (mitmekordse PCR-produkti puhul, millel on taimetele spetsiifilised sisekontrolli praimerid: oodatava suurusega teine PCR-produkt peab amplifitseeruma kõnealus prooviga).

PCR-analüüs on positiivne, kui avastatakse oodatava suuruse ja restriksioonipildiga (kui see on nõutav) bakterile *R. solanacearum* spetsiifiline PCR-amplikon, eeldusel et see ei amplifitseerunud mõnest negatiivse kontrolli proovist. Positiivse tulemuse usaldusväärse kinnituse saab ka siis, kui analüüsi korratakse teiste PCR-praimeritega (6. liide).

Märkus: PCR inhibeerumist võib kahtlustada siis, kui oodatav amplikon saadakse positiivse kontrolli proovist, mis sisaldab bakterit *R. solanacearum* vees, kuid negatiivseid tulemusi saadakse positiivsetest kontrollidest, mis sisaldavad bakterit *R. solanacearum* kartuliekstraktis. Mitmekordsetes PCR-protokollides sisemiste PCR-kontrollidega viitab reaktsiooni inhibeerumisele see, kui ei saada kumbagi amplikoni.

Saastumist võib kahtlustada siis, kui oodatav amplikon saadakse ühest või mitmest negatiivsest kontrollist.

7. FISH-analüüs

Põhimõte

Kui esimese sõelkatsena kasutatakse FISH-analüüsi ja tulemus on positiivne, tuleb teise kohustusliku sõelkatsena teha isolatsioon- või IF-analüüs. Kui FISH-analüüsi kasutatakse teise sõelkatsena ja tulemus on positiivne, tuleb lõpliku diagnoosi panemiseks teha vastavalt diagrammile täiendavaid analüüse.

Märkus: kasutatakse valideeritud bakterile *R. solanacearum* spetsiifilisi oligosonde (vt 7. liide). Eelanalüüsid sellel meetodil peaksid võimaldama taasavastada varem negatiivse tulemuse andnud prooviekstraktidele lisatud vähemalt 10^3 – 10^4 bakteri *R. solanacearum* rakku milliliitris.

Järgmist meetodit tuleks eelistatavalt kasutada värskest valmistatud prooviekstraktiga, kuid seda võib edukalt kasutada ka prooviekstraktiga, mida on säilitatud glütserooli all temperatuuril – 16 kuni – 24 °C või – 68 kuni – 86 °C.

Negatiivse kontrollina kasutatakse sama proovi alikvoote, mis andsid varem bakteri *R. solanacearum* negatiivse tulemuse.

Positiivseteks kontrollideks valmistatakse 3–5 päeva vanusest bakteri *R. solanacearum* biotüübi 2 kultuurist (näiteks tüvi NCPPB 4156 või PD 2762 või CFBP 3857, vt 3. liide) suspensioonid, mis sisaldavad 10^5 kuni 10^6 rakku milliliitri kohta 0,01 M fosfaatpuhvis. Valmistatakse vastavalt liitele 3 B kartuliekstraktis suspendeeritud bakteri *R. solanacearum* homoloogse tüve või mis tahes muu referenttüve eraldi positiivsed kontrollobjektiklaasid.

FITC-värvainega konjugeeritud eubakteriaalsete oligoproovide kasutamine võimaldab kontrollida hübriidsatsiooni protsessi, sest see värvib kõik proovis olevad eubakterid.

Positiivne ja negatiivne standardiseeritud kontrollmaterjal, mida saab kasutada nende analüüside puhul, on loetletud 3. liite punktis A.

Kontrollmaterjali analüüsitakse samamoodi kui proovi (proove).

7.1. Kartuliekstrakti fikseerimine

Järgmine protokoll põhineb allikal Wullings *et al.* (1998).

7.1.1. Valmistatakse kinnitilahas (vt 7. liide).

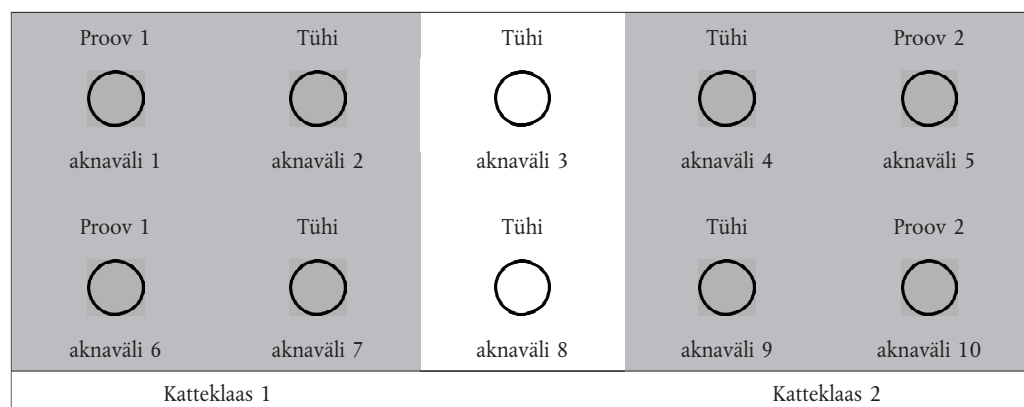
7.1.2. Igast prooviekstraktist pipetatakse 100 µl Eppendorfi topsi ja tsentrifugeeritakse 7 minutit 7 000 g juures.

7.1.3. Eemaldatakse supernatant ja bakterisade lahustatakse 200 µl kinnitis, mis valmistati kuni 24 tundi varem. Loksutatakse vorteksil ja inkubeeritakse 1 tund külmikus.

7.1.4. Tsentrifugeeritakse 7 minutit 7 000 g juures, eemaldatakse supernatant ja bakterisade resuspendeeritakse 75 µl 0,01 M fosfaatpuhvis (vt 7. liide).

7.1.5. Fikseeritud suspensioonidest tilgutatakse 16 µl puhtale mitmeaknalisele objektiklaasile vastavalt joonisele 7.1. Igale objektiklaasile pannakse 2 erinevat lahjendamata proovi ning 10 µl kasutatakse 1:100 lahjenduse tegemiseks (0,01 M fosfaatpuhvis). Ülejäänud proovilahust (49 µl), millele on eelnevalt lisatud 1 maht 96 % etanooli, võib säilitada – 20 °C juures. Juhul kui FISH-analüüsi tuleb uuesti teha, eemaldatakse etanool tsentrifugeerimise teel ja lisatakse sellega võrdne kogus 0,01 fosfaatpuhvit (loksutakse vorteksil).

Joonis 7.1. FISH-objektiklaasi joonis



- 7.1.6. Objektiklaasid kuivatatakse õhu käes (või objektiklaaside kuivatis 37 °C juures) ja fikseeritakse, kuumutades klaase läbi leegi.

Selles etapis võib menetluse katkestada ja jätkata hübriidiseerimist järgmisel päeval. Objektiklaase tuleb hoida tolmuvabas ja kuivas kohas toatemperatuuril.

7.2. Hübriidiseerimine

- 7.2.1. Rakud veetustatakse 50 %, 80 % ja 96 % etanooli reas, igas etapis 1 minut. Objektiklaasid kuivatatakse objektiklaaside hoidikul õhu käes.

- 7.2.2. Valmistatakse ette niiske inkubatsioonikamber, kattes õhukindla kasti põhja kuivatus- või filterpaberiga, mis on kastetud 1x hybmix-lahusesse (7. liide). Kast eelinkubeeritakse hübriidiseerimise ajaks 45 °C juures vähemalt 10 minutit.

- 7.2.3. Pannakse 10 µl hübriidiseerimise lahust (7. liide) 8 aknavälja (aknaväljad 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 ja 10, vt joonis 7.1) igale objektiklaasile, jättes kaks keskmist aknavälja (3 ja 8) tühjaks.

- 7.2.4. Esimesele ja viimasele neljale aknale asetatakse katteklasaad (24 × 24 mm) nii, et vahele ei jää õhku. Objektiklaasid pannakse eelsoojendatud niiskesse kambrisse ja hübriidiseeritakse 5 tunni jooksul ajaks 45 °C juures pimedas.

- 7.2.5. Valmistatakse ette 3 keeduklaasi, mis sisaldavad 1 l Milli Q (molekulaarbioloogias kasutatava puhtusastmega) vett, 1 l 1x hybmix-lahust (334 ml 3x hybmix-lahust ja 666 ml Milli Q vett) ja 1 l 1/8x hybmix-lahust (42 ml 3x hybmix-lahust ja 958 ml molekulaarbioloogias kasutatavat vett). Iga keeduklaasi eelinkubeeritakse vesivannis 45 °C juures.

- 7.2.6. Objektiklaasidelt eemaldatakse katteklasaadid ja objektiklaasid asetatakse objektiklaaside hoidikule.

- 7.2.7. Ülemäärane oligoproov pestakse ära, inkubeerides 15 minutit 45 °C juures keeduklaasis, milles on 1x hybmix-lahus.

- 7.2.8. Objektiklaaside hoidik pannakse 1/8 hybmix-pesulahusesse ja inkubeeritakse veel 15 minutit.

- 7.2.9. Objektiklaasid kastetakse lühidalt Milli Q vette ja pannakse filterpaberile. Liigne niiskus eemaldatakse, kattes pinna õrnalt filterpaberiga. Igale aknaväljale pipetatakse 5–10 µl pleekimisvastast kattevedelikku (näiteks Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA või samaväärset) ja üle terve objektiklaasi pannakse suur katteklasaad (24 × 60 mm).

7.3. FISH-analüüsi tulemused

- 7.3.1. Objektiklaase vaadeldakse viivitamatult mikroskoobis, millele on paigaldatud epifluorestsentsvalgusallikas ja kasutatakse õliimmersiooni suurendusel 630 või 1 000 korda. Fluorestsentsisototsüanaadile (FITC) sobiva filtriga värvuvad proovis olevad eubakterite rakud (sealhulgas enamik gramnegatiivseid rakke) fluorestsentseeruvad. Kasutades tetrametiülrodamiin-5-isototsüanaadile sobivat filtrit, paistavad bakterid *R. solanacearum* Cy3-ga värvunud rakud fluorestsentseeruvad. Raku morfoloogiat võrreldakse positiivsete kontrollidega. Rakudest peavad eredalt fluorestsentseeruma ja olema täielikult värvunud. Kui fluorestsentseerumine ei ole täielik, tuleb FISH-analüüsi (VI jao punkt A.7) korrata. Aknavälja vaadeldakse risti läbi kahe diameetri täisnurga suhtes ja ümber aknavälja välisääre. Proovide puhul, kus ei paista üldse või paistab ainult väga vähe rakke, vaadeldakse vähemalt 40 mikroskoobi vaatevälja.

- 7.3.2. Vaadeldakse bakterid *R. solanacearum* iseloomuliku morfoloogiaga eredalt fluorestsentseeruvaid rakke objektiklaaside aknaväljades (vt veebileht <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Fluorestsentseerumise intensiivsus peab olema positiivse kontrolli fluorestsentseerumise intensiivsusega võrdne või sellest parem. Lõplikult värvumata või nõrgalt fluorestsentseeruvad rakud jäetakse kõrvale.

- 7.3.3. Mis tahes saastumiskahtluse korral tuleb analüüsi korrata. Näiteks siis, kui partii kõigil objektiklaasidel on positiivseid rakke puhvri saastumise tõttu või kui leitakse positiivseid rakke objektiklaasi pinnal (väljaspool aknavälja).

- 7.3.4. FISH-analüüsi spetsiifilisuse tõttu on mitmeid probleeme. Kartuli basaalse tipusüdamiku ja varreosa kontsentreeritud bakterisademetes võib esineda ebatüüpilise morfoloogiaga fluorestseeruvate rakkude taustpopulatsioonid ning bakteriga *R. solanacearum* sarnase suuruse ja morfoloogiaga ristuvat reageerivaid saprofüütbaktereid, kuigi palju harvem kui IF-analüüsis.
- 7.3.5. Arvesse võetakse üksnes tüüpilise suuruse ja morfoloogiaga fluorestseeruvaid rakke.
- 7.3.6. FISH-analüüsi tulemuse tõlgendamine
- FISH-analüüsi valiidset tulemust saadakse siis, kui FITC-filtrit kasutades vaadeldakse bakterile *R. solanacearum* omase suuruse ja tüüpilise morfoloogiaga ererohelisi fluorestseeruvaid rakke ja rodamiinfiltrit kasutades erepunaseid fluorestseeruvaid rakke kõigis positiivsetes kontrollides ja mitte üheski negatiivses kontrollis. Kui objektiklaasi aknaväljal esineb morfoloogiliselt tüüpilisi eredalt fluorestseeruvaid rakke, määratakse keskmine rakkude arv mikroskoobi vaatevälja kohta ja arvutatakse tüüpiliste rakkude arv resuspendeeritud bakterisademe milliliitris (4. liide). Saatumiskahvlusega proovideks loetakse proove, milles on vähemalt 5×10^3 tüüpilist rakku resuspendeeritud bakterisademe milliliitris. Tuleb teha täiendavaid analüüse. Proovid, milles on alla 5×10^3 tüüpilise raku uuesti suspendeeritud bakterisadema milliliitris, loetakse negatiivseteks.
 - FISH-analüüs on negatiivne siis, kui rodamiinfiltrit kasutades ei vaadelda bakterile *R. solanacearum* omase suuruse ja tüüpilise morfoloogiaga erepunaseid fluorestseeruvaid rakke, tingimusel et rodamiinfiltrit kasutades vaadeldakse erepunaseid fluorestseeruvaid rakke positiivsete kontrollide preparaates.

8. ELISA-analüüs

Põhimõte

Suhteliselt madala tundlikkuse tõttu võib ELISA-analüüsi kasutada vabatahliku lisana IF-, PCR- või FISH-analüüsidele. DASI ELISA kasutamisel on rikastamine ja monokloonsete antikehade kasutamine kohustuslik (vt veebileht <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Proovide rikastamine enne ELISA-analüüsi võib olla analüüsi tundlikkuse tõstmiseks kasulik, kuid see võib ebaõnnestuda teiste võistlevate organismide tõttu proovis.

Märkus: kasutatakse *R. solanacearum*'i antikehade valideeritud allikat (vt veebileht <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). On soovitatav määrata iga uue antikehapartii tiiter. Tiiter on kõrgeima kontsentratsiooniga lahus, mille juures toimub optimaalne reaktsioon, kui tehakse analüüsi suspensiooniga, mis sisaldab 10^5 kuni 10^6 bakterit *R. solanacearum* homoloogse tüve rakku milliliitris, ja kasutatakse kohast sekundaarse antikeha konjugaati vastavalt tootja soovitudele. Analüüside käigus tuleks kasutada antikehade lahjendusi, mis on kaubandusliku valmistise tiitri lähedal või sellega võrdsed. Määratakse antikehade tiiter, kasutades *R. solanacearum*'i homoloogse tüve suspensiooni sisaldusega 10^5 kuni 10^6 rakku milliliitri kohta.

Negatiivsete kontrollidena kasutatakse prooviekstrakti, mis andis varem bakterit *R. solanacearum* osas negatiivse tulemuse, ja ristuvat mittereageeriva bakterit suspensiooni fosfaatpuhvri lisandiga keedusoolalahuses (PBS).

Positiivsete kontrollidena kasutatakse sama proovi alikvoote, mis andsid varem negatiivse tulemuse segatuna bakterit *R. solanacearum* biotüübi 2 tüvedega 10^3 kuni 10^4 rakku milliliitris (näiteks tüvi NCPPB 4156 või PD 2762 või CFBP 3857, vt 2. liite punktid A ja B). Tulemuste võrdlemiseks kasutatakse kõigil söötmeplaatidel *R. solanacearum*'i standardlahust 10^5 kuni 10^6 rakku milliliitris fosfaatpuhvri lisandiga keedusoolalahuses (PBS). Positiivsed kontrollid peavad olema mikroitiiterplaadil kindlalt eraldatud analüüsitavast proovist (analüüsitavatest proovidest).

Positiivne ja negatiivne standardiseeritud kontrollmaterjal, mida saab kasutada nende analüüside puhul on loetletud 3. liite punktis A.

Kontrollmaterjali analüüsitakse samamoodi kui proovi (proove).

Valideeritud on kaks ELISA protokollid.

a) Kaudne ELISA (Robinson-Smith *et al.*, 1995)

- Võetakse 100–200 µl prooviekstrakti alikvooti. (Kuumutamine 4 minuti jooksul temperatuuril 100 °C vesi-vannis või kuumutusplakil võib mõnel juhul vähendada mittespetsiifilisi tulemusi.)
- Lisatakse samaväärne kogus kahekordset kattepuhvrit (4. liide) ja loksutatakse vorteksil.
- Igast proovist mõõdetakse vähemalt 100 µl kahte mikroitiiterplaadi auku (nt Nunc-Polysorp või samaväärne) ja inkubeeritakse üks tund 37 °C juures või öö jooksul 4 °C juures.

- 4) Järsu löögiga raputatakse ekstrakt plaadiaukudest välja. Auke pestakse kolm korda PBS-Tweeniga (4. liide), jättes viimase pesukorra lahuse vähemalt viieks minutiks plaadiaukudesse.
 - 5) Valmistatakse *R. solanacearum*'i antikehade sobiv lahendus blokeerimispuhvrise (4. liide). Valideeritud, müügil olevate antikehade puhul kasutatakse soovitud lahendust (tavaliselt kaks korda kontsentreeritud kui tiiter).
 - 6) Lisatakse 100 µl igasse auku ja inkubeeritakse üks tund 37 °C juures.
 - 7) Järsu löögiga raputatakse antikehalahus plaadiaukudest välja, auke pestakse, nagu on eespool kirjeldatud (alapunkt 4).
 - 8) Valmistatakse sekundaarse antikeha leeliselise fosfataaskonjugaadi sobiv lahendus blokeerimispuhvrise. Lisatakse 100 µl igasse auku ja inkubeeritakse üks tund 37 °C juures.
 - 9) Järsu löögiga raputatakse konjugeeritud antikeha plaadiaukudest välja, auke pestakse, nagu on eespool kirjeldatud (alapunkt 4).
 - 10) Lisatakse 100 µl leeliselise fosfataassubstraadi lahust (4. liide) igasse auku. Inkubeeritakse pimedas toatemperatuuril ja mõõdetakse neeldumist lainepikkusel 405 nm korrapäraste ajavahemike järel 90 minuti jooksul.
- b) DASI ELISA
- 1) Valmistatakse *R. solanacearum*'i määramiseks polükloonsete antikehade sobiv lahendus kattepuhvrise pH 9,6 (4. liide). Igasse auku lisatakse 200 µl. Inkubeeritakse 4–5 tundi 37 °C juures või 16 tundi 4 °C juures.
 - 2) Auke pestakse kolm korda PBS-Tweeniga (4. liide).

Lisatakse 190 µl prooviekstrakti vähemalt kahte auku. Positiivseid ja negatiivseid kontrollid lisatakse kumbagi kahte auku igal plaadil. Inkubeeritakse 16 tundi 4 °C juures.
 - 3) Auke pestakse kolm korda PBS-Tweeniga (4. liide).
 - 4) Valmistatakse *R. solanacearum*'i määramiseks spetsiifiliste monokloonsete antikehade sobiv lahendus fosfaatpuhvri lisandiga keedusoolalahuses (PBS) (4. liide), mis sisaldab ka 0,5 % veise albumiinseerumit (BSA), ja lisatakse 190 µl igasse auku. Inkubeeritakse 2 tundi 37 °C juures.
 - 5) Auke pestakse kolm korda PBS-Tweeniga (4. liide).
 - 6) Valmistatakse hiirevastase immunoglobuliini sobiv lahus, mis on konjugeeritud leeliselise fosfataassubstraadiga fosfaatpuhvri lisandiga keedusoolalahuses (PBS). Igasse auku lisatakse 190 µl. Inkubeeritakse 2 tundi 37 °C juures.
 - 7) Auke pestakse kolm korda PBS-Tweeniga (4. liide).
 - 8) Valmistatakse leeliseline fosfataassubstraadilahus, mis sisaldab 1 mg p-nitrofenüülfosfaati substraatpuhvri milliliitri kohta (4. liide). Igasse auku lisatakse 200 µl. Inkubeeritakse pimedas toatemperatuuril ja mõõdetakse neeldumist lainepikkusel 40 nm korrapäraste ajavahemike järel 90 minuti jooksul.

ELISA-analüüsi tulemuste tõlgendamine

ELISA-analüüs on negatiivne, kui kahe proovi augu arvutatud keskmine optiline tihedus on väiksem kui negatiivse kontrolli prooviekstrakti augu kahekordse optilise tiheduse väärtus, tingimusel et kõigi positiivsete kontrollide optiline tihedus on üle 1,0 (pärast 90minutilist inkubatsiooni substraadis) ning see on suurem kui negatiivsete prooviekstraktide kahekordne optiline tihedus.

ELISA-analüüs on positiivne, kui kahe proovi augu arvutatud keskmine optiline tihedus on suurem kui negatiivse kontrolli prooviekstrakti augu kahekordse optilise tiheduse väärtus, tingimusel et kõigi negatiivse kontrolli aukude optiline tihedus on väiksem kui positiivse kontrolli aukude kahekordne optiline tihedus.

ELISA-analüüsi positiivse kontrolli aukude negatiivsed näidud osutavad, et analüüs ei ole korrektselt läbi viidud või seda on inhibeeritud. ELISA-analüüsi negatiivse kontrolli aukude positiivsed näidud osutavad, et on toimunud rist-saastumine või mittespetsiifiline antikehade sidumine.

9. Biotest

Märkus: eelanalüüsid sellel meetodil peaksid võimaldama reprodutseeritavalt avastada varem negatiivse tulemuse andnud prooviekstraktidele lisatud 10^3 kuni 10^4 bakteri *R. solanacearum* kolooniaid moodustavat üksust milliliitris (valmistamist vt 2. liites).

Suurimat avastustundlikkust võib loota siis, kui kasutatakse äsja valmistatud prooviekstrakti ja optimaalseid kasvu-tingimusi. Meetodit saab siiski kasutada edukalt nende ekstraktidega, mida on säilitatud glütserooli all temperatuuril -68 kuni -86 °C.

Järgneva protokollil aluseks on Janse (1988).

- 9.1. Iga proovi kohta võetakse kümme tundliku tomatisordi (nt "Moneymaker" või sort, mille tundlikkuse on testlabor määranud olevat samaväärse) testtaime, millel on välja kasvanud 3. pärisleht. Andmed kultuuris kasvatamise kohta on 8. liites. Teise võimalusena võib kasutada baklažaani (nt sort "Black Beauty" või samasuguse tundlikkusega sort), kasutatakse ainult neid taimi, mis on 2–3 lehe faasis kuni kolmanda pärislehe täieliku väljakasvamiseni. On ilmnenud, et baklažaani on sümptomid vähem tõsised ja arenevad aeglasemalt. Seetõttu soovitatakse võimaluse korral kasutada tomatiseemikuid.

- 9.2. 100 µl prooviekstrakti jagatakse testtaimede vahel.

9.2.1. Inokulatsioon süstla abil

Taimede varsi inokuleeritakse idulehtede kohal hüpodermilise nõelaga süstlaga (vähemalt 23G). Proov jaotatakse testtaimede vahel.

9.2.2. Inokulatsioon sisselõike kaudu

Taime kahe sõrme vahel hoides pipetatakse suspendeeritud bakterisademe tilk (ligikaudu 5–10 µl) varrele idulehtede ja esimese lehe vahele.

Steriilse skalpelliga tehakse 1 cm pikkune diagonaalne sisselõige, mille sügavus on ligikaudu 2/3 varre paksusest, alustades sisselõiget bakterisademe tilga kohast.

Sisselõige kaetakse süstla abil steriilse vaseliiniga.

- 9.3. Samal viisil nakatatakse viis taime 48tunnise virulentse *R. solanacearum* biotüübi 2 vesisuspensiooniga 10^5 kuni 10^6 rakku milliliitri kohta, mis on positiivseks kontrolliks, ning negatiivseks kontrolliks nakatatakse taimi bakterisademe puhvriga (4. liide). Positiivsed ja negatiivsed kontrolltaimed tuleb teistest taimedest isoleerida, et vältida ristnakatumist.

- 9.4. Testtaimi kasvatatakse karantiiniruumides kuni neli nädalat 25–30 °C ja kõrge suhtelise niiskuse juures ja neid kasvatatakse nii, et ei tekiks ülekastmist või taimede närbumist veepuuduse tõttu. Saastumise vältimiseks inkubeeritakse positiivseid ja negatiivseid kontrolltaimi selgelt eraldatud lavadel kasvuhooes või kasvukambriis või, kui ruumi on vähe, tagatakse rangelt eristatus töötlemiste vahel. Kui erinevate proovide taimi tuleb inkubeerida lähestikku, eraldatakse need kohaste varjetega. Väetamisel, kastmisel, kontrollimisel ja mis tahes muude tegevuste juures pööratakse suurt tähelepanu rist-saastumise vältimisele. Oluline on puhastada kasvuhooned ja kasvukambriid kõigest putukkahjureist, sest need võivad kanda bakteri ühelt taimelt teisele.

Jälgitakse närbumise, lehtede keerdumise, kloroosi ja/või kangumise tundemärke.

- 9.5. Isoleeritakse haigestunud taimedest (II jao punkt 3) ja identifitseeritakse eeldatavad *R. solanacearum*'i puhastatud kultuurid (VI jao punkt B).
- 9.6. Kui kolme nädala möödumisel sümptomeid ei ilmne, tehakse IF/PCR/isolatsioonianalüüsid liitproovist, mis koosneb igalt katsetaimelt ülalpool inokulatsioonikohta võetud 1 cm varreosadest. Kui analüüsid on positiivsed, valmistatakse lahjendused ja tehakse väljakülvid söötmeplaatidele (punkt 4.1).
- 9.7. Määratakse kindlaks bakteri *R. solanacearum* eeldatavad puhastatud kultuurid.

Biotesti tulemuste tõlgendamine

Valiidsed biotesti tulemused saadakse siis, kui positiivsetel kontrolltaimedel on tüüpilised sümptomid, nendest taimedest saab uuesti isoleerida bakterid ja negatiivsetel kontrollidel ei leita sümptomeid.

Biotesti tulemus on negatiivne, kui testtaimed ei ole saastunud *R. solanacearum*'i kultuuriga, tingimusel et *R. solanacearum* on avastatud positiivsetes kontrolltaimedes. Biotest on positiivne, kui testtaimed on *R. solanacearum*'i kultuuriga saastunud.

B. IDENTIFITSEERIMISANALÜÜSID

Bakteri *R. solanacearum* eeldatavad puhaskultuurid määratakse kindlaks, kasutades vähemalt kaht järgmistest analüüsides, mis põhinevad erinevatel bioloogilistel põhimõtetel.

Igasse tehtavasse analüüsi kaasatakse tuntud referenttüved, kui see on asjakohane (vt 3. liide).

1. Toitumuslikud ja ensümaatilised identifitseerimisanalüüsid

Määratakse järgmised fenotüübilised omadused, mis esinevad või puuduvad bakteril *R. solanacearum*, kasutades järgmistes allikates kirjeldatud meetodeid: Lelliott ja Stead (1987), Klement *et al.* (1990), Schaad (2001).

Analüüs	Oodatav tulemus
Fluorestseeruv pigment	–
Polü-β-hüdroksübutüraadi esinemine	+
Oksüdatsiooni/fermentatsioonianalüüs (O/F-analüüs)	O+/F–
Katalaasi aktiivsus	+
Kovaci oksüdaasianalüüs	+
Nitraatide redutseerimine	+
Tsitraadi kasutamine	+
Kasv 40 °C juures	–
Kasv 1 % NaCl-s	+
Kasv 2 % NaCl-s	–
Arginiini dihidrolaas	–
Želatiini veeldamine	–
Tärglise hüdrolyüs	–
Aesuliini hüdrolyüs	–
Levani tootmine	–

2. IF-analüüs

- 2.1. Valmistatakse suspensioon, milles on umbes 10⁶ rakku milliliitris IF-puhvrts (4. liide).
- 2.2. Valmistatakse kohase antiseerumi kahekordsete lahjenduste rida (vt veebileht <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).
- 2.3. Tehakse IF-analüüs (VI jao punkt A.5).
- 2.4. IF-analüüsi tulemus on positiivne siis, kui kultuuri IF-tiiter võrdub positiivse kontrolli tiitriga.

3. ELISA-analüüs

Märkus: kui kasutatakse vaid kaht määramisanalüüsi, ei tohi lisaks sellele meetodile kasutada teist seroloogilist analüüsi.

- 3.1. Valmistatakse suspensioon, milles on umbes 10^8 rakku milliliitris 1X PBS-puhvril (4. liide).
- 3.2. Tehakse sobiv ELISA-analüüs *R. solanacearum*'i spetsiifilise monoklonaalse antikehaga.
- 3.3. ELISA-analüüs on positiivne, kui kultuuri ELISA-analüüsi tulemus on vähemalt pool positiivse kontrolli tulemusest.

4. PCR-analüüs

- 4.1. Valmistatakse suspensioon, milles on umbes 10^6 rakku milliliitris molekulaarbioloogias kasutatava puhtusastmega steriilses vees.
- 4.2. 100 µl suletud katseklaasides olevat rakususpensiooni kuumutatakse kuumutusplakil või keevas veevannis 100 °C juures 4 minutit. Seejärel võib proove säilitada –16 kuni –24 °C juures, kuni neid on tarvis.
- 4.3. Bakteri *R. solanacearum* spetsiifiliste amplikonide amplifitseerimiseks tehakse kohane PCR-analüüs (nt Seal *et al.* (1993), Pastrik ja Maiss (2000), Pastrik *et al.* (2002), Boudazin *et al.* (1999), Opina *et al.* (1997), Weller *et al.* (1999)).
- 4.4. Bakteri *R. solanacearum* saab positiivselt kindlaks määrata siis, kui PCR-amplikonidel on positiivse kontrolli tüvega sama suurus ja neil esineb sama pikkusega restriksioonifragmentide polümorfism.

5. FISH-analüüs

- 5.1. Valmistatakse suspensioon, milles on umbes 10^6 rakku milliliitris ultrapuhtas vees.
- 5.2. Tehakse FISH-analüüs (VI jao punkt A.7) vähemalt kahe *R. solanacearum*-spetsiifilise oligoprooviga (7. liide).
- 5.3. FISH-analüüsi tulemus on positiivne siis, kui kultuur ja positiivne kontroll annavad samad reaktsioonid.

6. Rasvhapete profileerimine (FAP)

- 6.1. Kultuuri kasvatatakse trüptikaas-sojaagaril (Oxoid) 48 tundi temperatuuril 28 °C.
- 6.2. Tehakse kohane FAP-analüüs (Janse, 1991; Stead, 1992).
- 6.3. FAP-analüüsi tulemus on positiivne siis, kui eeldatava kultuuri profiil on identne positiivse kontrolli profiiliga. Tüüpiline rasvhapete esinemine on järgmine: 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH ja 18:1 2OH ning tüüpiline on 16:0 3OH puudumine. Selline profiil osutab suure tõenäosusega bakterile *Ralstonia* sp.

7. Tüve iseloomustamise meetodid

R. solanacearum'i iga uue isoleerimisjuhtumi puhul on soovitatav kasutada üht järgmistest tüve iseloomustamise meetoditest.

Igasse tehtavasse analüüsi kaasatakse tuntud referenttüved, kui see on asjakohane (vt 3. liide).

7.1. Biotüübi määramine

R. solanacearum jagatakse biotüüpidesse selle põhjal, kuidas see suudab kasutada ja/või oksüdeerida kolme disahhariidi ja kolme heksoosalkoholi (Hayward, 1964 ja Hayward *et al.*, 1990). Biotüübi kasvusöödet kirjeldatakse 2. liites. Analüüsi saab edukalt teha, inokuleerides söödet *R. solanacearum*'i puhaskultuuridega ja inkubeerides 28 °C juures. Kui steriilsele 96 auguga rakukultuuri söötmeplaadile (200 µl augu kohta) jaotatud sööde muutub 72 tunni jooksul oliivrohelistest kollaseks, on analüüsi tulemus positiivne.

	Biotüüp				
	1	2	3	4	5
Järgmiste ainete kasutamine:					
maltoos	–	+	+	–	+
laktoos	–	+	+	–	+
D (+) tsellobioos	–	+	+	–	+
mannitool	–	–	+	+	+
sorbitool	–	–	+	+	–
dultsitool	–	–	+	+	–

Lisaanalüüsides eristatakse biotüübi 2 alamfenotüüpe

	Biotüüp 2A (Levinud üle maailma)	Biotüüp 2A (Leitud Tšiilis ja Kolumbias)	Biotüüp 2T (Leitud troopilistel aladel)
Trehhaloosi kasutamine	–	+	+
Meso-inositooli kasutamine	+	–	+
D-riboosi kasutamine	–	–	+
Pektolüütiline aktiivsus (1)	madal	madal	kõrge

(1) Vt Lelliott ja Stead (1987).

7.2. Genoomse “sõrmejäljendi” võtmine

Haigusetekitaja *R. solanacearum* liitüvede molekulaarseks eristamiseks võib kasutada erinevaid meetodeid, sealhulgas järgmised.

7.2.1. Restriksioonifragmentide pikkuse polümorfismi (RFLP) analüüs (Cook *et al.*, 1989).

7.2.2. Korduvjärjestusega PCR, kasutades REP, BOX ja ERIC praimereid (Louws *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995).

7.2.3. Amplifitseeritud fragmentide pikkuse polümorfismi (AFLP) analüüs (Van der Wolf *et al.*, 1998).

7.3. PCR-meetodid

Eristamiseks tüvesid, mis kuuluvad RFLP analüüsi (Cook *et al.*, 1989) ja 16S rDNA järjestuse määramise (Taghavi *et al.*, 1996) kohaselt *R. solanacearum*'i 1. (biotüübid 3, 4 ja 5) ja 2. rühma (biotüübid 1, 2A ja 2T), võib kasutada spetsiifilisi PCR-praimereid (Patrik *et al.*, 2002; vt 6. liide).

C. KINNITUSANALÜÜS

R. solanacearum'i diagnoosi lõplikuks kinnitamiseks ning *R. solanacearum*'ina identifitseeritud bakterikultuuri virulentsuse hindamiseks tuleb teha patogeensusanalüüs.

- Analüüsitava isolaadi 24–28 tunni vanusest isolaadist ja bakteri *R. solanacearum* kohasest positiivse kontrolli tüvest (nt NCPPB 4156 või PD 2762 või CFBP 3857; vt 3. liide) tehakse inokulaat, milles on umbes 10^6 rakku milliliitris.
- Inokuleeritakse 5–10 tundlikku tomati- või baklažaaniseemikut, millel on välja kasvanud kolmas pärisleht (vt VI jao punkt A.9).

- 3) Inkubeeritakse kuni kaks nädalat temperatuuril 25–28 °C ning kõrge suhtelise niiskuse juures ja kastetakse parajal määral, et oleks välditud ülekestmine ja kuivamine. Puhaskultuuriga taimedel peaksid tekkima tüüpilised närbumissümptomid 15 päeva jooksul. Kui selle aja jooksul ei ole sümptomeid, ei saa kultuuri pidada *R. solanacearum*'i patogeenseks vormiks.
 - 4) Jälgitakse närbumise ja/või lehtede keerdumise, kloroosi ja kangumise tundemärke.
 - 5) Isoleeritakse sümptomitega taimedest, eraldades varreosa umbes 2 cm kõrguselt inokulatsioonipunktist. Purustatakse ja lahustatakse väikeses koguses steriilses destilleeritud vees või 50 mM fosfaatpuhvis (4. liide). Isoleeritakse suspensioonist, lahjendused hõõrutakse spaatliga laiali või tehakse joonkülv sobival söötmel, eelistatavalt selektiivsöötmel (2. liide), inkubeeritakse 48–72 tundi temperatuuril 28 °C ja jälgitakse bakterile *R. solanacearum* tüüpiliste kolooniate tekkimist.
-

1. liide

Protokollide optimeerimise ja valideerimisega tegelevad laborid

Labor ⁽¹⁾	Asukoht	Riik
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Viin ja Linz	Austria
Département Gewasbescherming	Merelbeke	Belgia
Plantedirektoratet	Lyngby	Taani
Central Science Laboratory	York	Inglismaa
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburgh	Šotimaa
Laboratoire national de la protection des végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	Prantsusmaa
Laboratoire national de la protection des végétaux, Station de quarantaine de la pomme de terre	Le Rheu	Prantsusmaa
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Saksamaa
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Saksamaa
State Laboratory	Dublin	Iirimaa
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali	Bologna	Itaalia
Regione Veneto Unità Periferica per i Servizi Fitosanitari	Verona	Itaalia
Nederlandse Algemene Keuringsdienst	Emmeloord	Madalmaad
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Madalmaad
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lissabon	Portugal
Centro de Diagnóstico de Aldearrubia	Salamanca	Hispaania
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias	Valencia	Hispaania
Swedish University of Agricultural Sciences	Uppsala	Rootsi

(¹) Kontaktteadurid – vt veebileht <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

2. liide

Söötmed haigusetekitaja *R. solanacearum* isoleerimiseks ja kultiveerimiseks

a) Üldised kasvusöötmed

Toiteagar

Toiteagar (Difco)	23,0 g
Destilleeritud vesi	1,0 l

Ained lahustatakse ja steriliseeritakse autoklaavis 121 °C juures 15 minutit.

Pärmiekstraktiga glükoospeptonagar (YPGA)

Pärmiekstrakt (Difco)	5,0 g
Bacto-pepton (Difco)	5,0 g
D(+)-glükoos (monohüdraat)	10,0 g
Bacto-agar (Difco)	15,0 g
Destilleeritud vesi	1,00 l

Ained lahustatakse ja steriliseeritakse autoklaavis 121 °C juures 15 minutit.

Sahharoos-peptonagar (SPA)

Sahharoos	20,0 g
Bacto-pepton (Difco)	5,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g
Bacto-agar (Difco)	15,0 g
Destilleeritud vesi	1,0 l

pH 7,2–7,4

Ained lahustatakse ja steriliseeritakse autoklaavis 121 °C juures 15 minutit.

Kelmani tetrasooliumsööde

Kasaminohapped (Difco)	1,0 g
Bacto-pepton (Difco)	10,0 g
Dekstroos	5,0 g
Bacto-agar (Difco)	15,0 g
Destilleeritud vesi	1,0 l

Ained lahustatakse ja steriliseeritakse autoklaavis 121 °C juures 15 minutit.

Jahutatakse temperatuurini 50 °C ning läbi steriilse filtri lisatakse 2,3,5-trifenüültetrasooliumkloriidi (Sigma) vesilahust, nii et lõplik kontsentratsioon lahuses on 50 mg/l.

b) Valideeritud selektiivsed kasvusöötmed

SMSA-sööde (Engelbrecht, 1994, muudetud Elphinstone et al., 1996).

Põhisööde

Kasaminohapped (Difco)	1,0 g
Bacto-pepton (Difco)	10,0 g
Glütserool	5,0 ml
Bacto-agar (Difco); vt Märkus 2.	15,0 g
Destilleeritud vesi	1,00 l

Ained lahustatakse ja steriliseeritakse autoklaavis 121 °C juures 15 minutit.

Jahutatakse temperatuurini 50 °C ning läbi steriilse filtri lisatakse järgmiste koostisosade põhivesilahust, et saada täpselt määratletud lõppkontsentratsioonid.

Kristallviolett (Sigma)	5 mg/l
Polümüksiin-B-sulfaat	(Sigma P-1004) 600 000 U (ligikaudu 100 mg)/l
Batsitratsiin (Sigma B-0125)	1 250 U (ligikaudu 25 mg)/l
Klooramfenikool (Sigma C-3175)	5 mg/l
Penitsiliin-G (Sigma P-3032)	825 U (ligikaudu 0,5 mg)/l
2,3,5-trifenüültetrasooliumkloriid (Sigma)	50 mg/l

MÄRKUS

1. Muude reaktiivide kasutamine peale ülalootetute võib mõjutada *R. solanacearum*'i kasvu.
2. Bacto-agari (Difco) asemel võib kasutada Oxoid-agarit nr 1. Sel juhul on *R. solanacearum*'i kasv aeglasem, ehkki võib redutseeruda ka võistlevate saprofüütbakterite kasv. *R. solanacearum*'i tüüpilised kolooniad võivad kujuneda 1–2 päeva hiljem ning punane värvus võib olla heledam ja hajusam kui Bacto-agaril.
3. Batsitratsiini kontsentratsiooni suurendamine kuni 2 500 U/l võib vähendada võistlevate bakterite populatsioone, mõjutamata *Ralstonia solanacearum*'i kasvu.

Söötmeid ja antibiootikumide põhilahuseid säilitatakse temperatuuril 4 °C pimedas ja kasutatakse kuu aja jooksul.

Söötmeplaatidel pinnal ei tohi enne kasutamist olla kondenseerumist.

Välditakse söötmeplaatide liigset kuivamist.

Pärast iga uue söötmepartii valmistamist tuleb teha kvaliteedikontroll, tehes *R. solanacearum*'i referentskultuuri väljakülvi söötmeplaadile (vt 3. liide) ja jälgides tüüpiliste kolooniate kujunemist pärast 2–5päevast inkubeerimist temperatuuril 28 °C.

c) Valideeritud rikastussöötmed

SMSA-puljong (*Elphinstone et al.*, 1996)

Valmistatakse samamoodi kui SMSA-selektiivsööde, kuid jäetakse välja Bacto-agar ja 2,3,5-tetrasooliumkloriid.

Modifitseeritud Wilbrinki puljong (*Caruso et al.*, 2002)

Sahharoos	10 g
Proteoospeptoon	5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,25 g
NaNO ₃	0,25 g
Destilleeritud vesi	1,0 l

Steriliseeritakse autoklaavis 121 °C juures 15 minutit ja jahutatakse maha 50 °C.

Lisatakse antibiootilised põhilahused nagu SMSA-puljongi puhul.

3. liide

A. Müügil olevad standardiseeritud kontrollmaterjalid

a) Bakterikolooniad

Positiivsete kontrollidena (tabel 1) või analüüside optimeerimisel (tabel 2) soovitatakse ristreaktsioonide vältimiseks kasutada standardse võrdlusmaterjalina järgmisi isoleeritud bakteritüvesid. Kõiki tüvesid saab osta järgmistest kohtadest:

1. National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPBP), Central Science Laboratory, York, Ühendkuningriik
2. Culture Collection of the Plant Protection Service (PD), Wageningen, Madalmaad
3. Collection française de bactéries phytopathogènes (CFBP), INRA – Station de phytobactériologie, Angers, Prantsusmaa

Tabel 1. *R. solanacearum*'i tüvede SMT viitenumbrid

NCPBP-kood	SMT nr	Muud koodid	Päritoluriik	Biotüüp
NCPBP 4153	6	CFBP 4582, Pr 3020, EURS11	Egiptus	2
NCPBP 4154	10	CFBP 4585, 550, EURS21	Türgi	2
NCPBP 3857	12	CFBP 4587, Pr 1140, EURS26	Inglismaa	2
NCPBP 1584	23	CFBP 4598, EURS49	Küpros	2
NCPBP 2505	24	CFBP 4599, EURS50	Rootsi	2
NCPBP 4155	26	CFBP 4601, 502, EURS55	Belgia	2
NCPBP 4156 (*)	71 (*)	PD 2762, CFBP 3857	Madalmaad	2
NCPBP 4157	66	LNPV 15.59	Prantsusmaa	2
NCPBP 4158	39	CFBP 4608, Port 448, EURS80, NCPBP 4066	Portugal	2
NCPBP 4160	69	IVIA-1632-2	Hispaania	2
NCPBP 4161	76	B3B	Saksamaa	2
NCPBP 325	41	CFBP 2047, KEL60-1, R842	USA	1
NCPBP 3967	42	CFBP 4610, R285, GONG7	Costa Rica	1
NCPBP 4028	43	CFBP 4611, R303/571, CIP310, SEQ205	Colombia	2
NCPBP 3985	44	CFBP 4612, R578, CIP312	Peruu	2T
NCPBP 3989	45	CFBP 4613, R568, CIP226	Brasília	2T
NCPBP 3996	46	CFBP 3928, R276/355, CIP72, SEQ225	Peruu	3
NCPBP 3997	47	CFBP 4614, R280/363, CIP49, HAY0131a	Austraalia	3
NCPBP 4029	48	CFBP 4615, R297/349, CIP121, CM1b2861	Sri Lanka	4
NCPBP 4005	49	CFBP 4616, R470	Filipiinid	4
NCPBP 4011	50	CFBP 4617, R288, HEmp2	Hiina	5

(*) Kasutatakse *R. solanacearum*'i biotüübi 2 (rassi 3) standardse referenttüvena.

Märkus: eeloleatud tüvede autentsus on tagatud vaid siis, kui need saadakse autentsest kultuuride kogust.

Tabel 2. Määramisanalüüside optimeerimisel kasutatavate seroloogiliselt võigeneetiliselt seotud bakterite SMT viitenumber.

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

⁽¹⁾ Seroloogilistes analüüsid (IF ja/või ELISA) võimalik tüve ristuv reageerimine polükloonaalsete antiseerumitega.

⁽²⁾ Tüvi, millest mõnes laboris võib amplifitseerida sama suurusega PCR produkte kui spetsiifiliste praimerite OLI-1 ja Y-2 kasutamisel (vt 6. liide).

⁽³⁾ Reageerib ristuvalt tõenäoliselt enamikus analüüsid, kuid teadaolevalt esineb vaid banaanidel Indoneesias.

b) Müügil olevad standardiseeritud kontrollmaterjalid

Järgmisi standardiseeritud kontrollmaterjale saab NCPPB kultuuride kogust.

200 terve kartulimugula kartuliekstrakti külmuivatatud kontsenteeritud bakterisade külmutatakse kõikide analüüside negatiivseks kontrolliks.

200 terve kartulimugula kartuliekstrakti külmuivatatud kontsenteeritud bakterisade, mis sisaldab *R. solanacearum*'i biotüüp 2 (tüvi NCPPB 4156 või PD 2762 või CFBP 3857) 10^3 kuni 10^4 ja 10^4 kuni 10^6 raku seroloogiliste ja PCR-analüüside positiivseks kontrolliks. Kuna külmuivatamise käigus mõjutatakse rakkude eluvõimelisust, ei sobi need isolatsiooni- ja biotesti standardkontrollideks.

Seroloogiliste analüüside positiivseteks kontrollideks on *R. solanacearum*'i biotüüp 2 (tüvi NCPPB 4156 või PD 2762 või CFBP 3857) formaliiniga fikseeritud suspensioonid 10^6 raku milliliitri kohta.

B. Positiivsete ja negatiivsete kontrollide valmistamine

Tehakse bakteri *R. solanacearum*'i rassi 3/biotüübi 2 virulentse tüve (nt tüvi NCPPB 4156 või PD 2762 või CFBP 3857) 48tunnine kultuur SMSA-põhisõotmel ja suspendeeritakse 10 mM fosfaatpuhveris, et saada rakkude tiheduseks umbes 2×10^8 kolooniaid moodustavat osakest milliliitris. See saadakse tavaliselt veidi häguses suspensioonis, mis vastab 0,15 optilisele tihedusele 600 nanomeetris.

Eemaldatakse basaalsed tipusüdamikud 200 mugulalt, mis on pärit valgekoorelise sordi saagist, mille kohta on teada, et selles ei ole bakterit *R. solanacearum*.

Basaalseid tipusüdamikke töödeldakse tavaliselt ja bakterisade resuspendeeritakse 10 milliliitris.

Valmistatakse 10 steriilset 1,5 ml mikroampulli 900 µl resuspendeeritud bakterisademega.

100 µl bakteri *R. solanacearum* suspensiooni pannakse esimesse mikroampulli. Loksutatakse vorteksil.

Saastetase määratakse lahjenduste kümnendreaga järgmises viies mikroampullis.

Kuut saastunud mikroampulli kasutatakse positiivsete kontrollidena. Nelja saastumata mikroampulli kasutatakse negatiivsete kontrollidena. Mikroampullid märgistatakse vastavalt.

Steriilsetes 1,5 ml mikroampullides valmistatakse 100 µl alikvoodid ning saadakse seega iga kontrollproovi 9 replikoni. Säilitatakse – 16 kuni – 24 °C juures kuni kasutamiseni.

Bakteri *R. solanacearum* olemasolu ja kvantifikatsioon kontrollproovides tuleks esmalt kinnitada IF-analüüsiga.

PCR-analüüsiks ekstraheeritakse DNA positiivsetest ja negatiivsetest kontrollproovidest iga katseproovide seeria puhul.

IF- ja FISH-analüüsideks analüüsitakse positiivseid ja negatiivseid kontrollproove iga analüüsitavate proovide seeria puhul.

IF-, FISH- ja PCR-analüüsides tuleb avastada bakteri *R. solanacearum* vähemalt 10^6 ja 10^4 rakku milliliitris positiivsetes kontrollides ning bakterit ei tohi olla üheski negatiivses kontrollis.

4. liide

Analüüsimenetluste puhvrid

ÜLDNÕUE: avamata steriilseid puhvreid võib säilitada kuni ühe aasta.

1. Ekstraktsioonimenetluste puhvrid**1.1. Ekstraktsioonipuhver (50 mM fosfaatpuhver, pH 7,0)**

Seda puhvrit kasutatakse bakteri eraldamiseks taimekudedest homogeneenimise või loksutamise teel.

Na ₂ HPO ₄ (veevaba)	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
Destilleeritud vesi	1,00 l

Ained lahustatakse, kontrollitakse pH ja steriliseeritakse autoklaavis 121 °C juures 15 minutit.

Võib lisada muid aineid järgmiselt.

	<i>Eesmärk</i>	<i>Kogus (liitri kohta)</i>
Lubrol-helbed	Deflokulant (*)	0,5 g
DC-silikoniga vahutamistvastane aine	Vahutamistvastane aine (*)	1,0 ml
Tetranatriumpürofosfaat	Antioksidant	1,0 g
Polüvinüülpirrolidoon-40 000 (PVP-40)	PCR-inhibiitorite siduja	50 g

(*) Kasutamiseks ekstraktsioonimenetlustes homogeneenimise teel.

1.2. Bakterisademe puhver (10 mM fosfaatpuhver, pH 7,2)

Seda puhvrit kasutatakse kartulimugula basaalsete tipusüdami ke ekstraktide resuspendeerimiseks pärast kontsentreerimist bakterisademeks tsentrifuugimise teel.

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

Ained lahustatakse, kontrollitakse pH ja steriliseeritakse autoklaavis 121 °C juures 15 minutit.

2. IF-analüüsi puhvrid**2.1. IF-puhver (10 mM fosfaatpuhvri lisandiga keedusoolalahus (PBS), pH 7,2)**

Seda puhvrit kasutatakse antikehade lahendamiseks.

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

Ained lahustatakse, kontrollitakse pH ja steriliseeritakse autoklaavis 121 °C juures 15 minutit.

2.2. IF-puhver Tweeniga

Seda puhvrit kasutatakse objektiklaaside pesemiseks.

IF-puhvrile lisatakse 0,1 % Tween 20.

2.3. Fosfaatpuhvri lisandiga glütserool, pH 7,6

Seda puhvrit kasutatakse kattevedelikuna fluorestseerumise suurendamiseks IF-objektiklaaside aknaväljades.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	3,2 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,15 g
Glütserool	50 ml
Destilleeritud vesi	100 ml

Pleekimisvastased kattevedelikud on müügil, näiteks Vectashield® (Vector Laboratories) või Citifluor® (Leica).

3. Kaudse ELISA-analüüsi puhvrid

3.1. Kahekordne kattepuhver, pH 9,6

Na ₂ CO ₃	6,36 g
NaHCO ₃	11,72 g
Destilleeritud vesi	1,00 l

Ained lahustatakse, kontrollitakse pH ja steriliseeritakse autoklaavis 121 °C juures 15 minutit.

Antioksidandina võib lisada naatriumsulfitit (0,2 %), et vältida oksüdeerunud aromaatsete ühendite tekkimist.

3.2. 10 X fosfaatpuhvri lisandiga keedusoolalahus (PBS), pH 7,4

NaCl	80,0 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	29,0 g
KCl	2,0 g
Destilleeritud vesi	1,00 l

3.3. PBS-Tween

10 X PBS	100 ml
10 % Tween 20	5 ml
Destilleeritud vesi	895 ml

3.4. Blokeeriv (antikeha) puhver (puhver tuleb valmistada vahetult enne töö alustamist)

10 X PBS	10,0 ml
Polüvinüülpirrolidoon-44000 (PVP-44)	2,0 g
10 % Tween 20	0,5 ml
Piimapulber	0,5 g
Destilleeritud vesi	Täiendatakse 100 ml-ni

3.5. Leeliseline fosfataassubstraadi lahus, pH 9,8

Dietanoolamiin	97 ml
Destilleeritud vesi	800 ml

Segatakse ja kontsentreeritud HCl-ga reguleeritakse pH 9,8ni.

Maht täiendatakse destilleeritud veega 1 liitri.

Lisatakse 0,2 g MgCl₂.

Kaks fosfataassubstraadi 5 mg tabletti (Sigma) lahustatakse 15 ml lahuses.

4. **DASI ELISA analüüsi puhvrid**

4.1. Kattepuhver, pH 9,6

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g
Destilleeritud vesi	1 000 ml

Ained lahustatakse ja kontrollitakse pH 9,6.

4.2. 10 X fosfaatpuhvri lisandiga keedusoolalahus (PBS), pH 7,2–7,4

NaCl	80,0 g
NaH ₂ PO ₄ ·2 H ₂ O	4,0 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	27,0 g
Destilleeritud vesi	1 000 ml

4.3. PBS-Tween

10 X PBS	50 ml
10 % Tween 20	5 ml
Destilleeritud vesi	950 ml

4.4. Substraatpuhver, pH 9,8

Dietanoolamiin	100 ml
Destilleeritud vesi	900 ml

Segatakse ja kontsentreeritud HCl-ga reguleeritakse pH 9,8ni.

5. liide

Bakterite koguse määramine IF-ja FISH-analüüsid

1. Loendatakse keskmine tüüpiliste fluorestseeruvate rakkude arv välja kohta (c).
2. Arvutatakse tüüpiliste fluorestseeruvate rakkude arv objektiklaasi akna kohta (C).

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

kus S = mitmekohalise objektiklaasi aknavälja pindala

ja s = objektiivi pindala

$$s = \pi^2/4G^2K^2 \quad \text{kus} \quad i = \text{välja koefitsient (sõltub okulaari tüübist ja on 8-24)}$$

K = toru koefitsient (1 või 1,25)

G = objektiivi suurendus (100 korda, 40 korda jne).

3. Arvutatakse tüüpiliste fluorestseeruvate rakkude arv milliliitri resuspendeeritud bakterisademe kohta (N).

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

kus y = resuspendeeritud bakterisademe maht igas aknas

ja F = resuspendeeritud bakterisademe lahjendustegur.

6. liide

Valideeritud PCR-protokollid ja -reaktiivid

Märkus: eelanalüüsid peaksid võimaldama reprodutseeritavalt avastada vähemalt 10^3 kuni 10^4 bakteri *R. solanacearum* rakku proovieks-trakti milliliitris.

Eelanalüüsid ei tohiks anda valepositiivseid tulemusi valitud bakteritüvedega (vt 3. liide).

1. PCR-protokoll, Seal et al. (1993)

1.1. Oligonukleotiidpraimerid

Päripidine praimer OLI-1 5'-GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC-3'
 Äraspidine praimer Y-2 5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'

Bakteri *R. solanacearum* maatriks-DNA eeldatav amplikonipikkus on 288 aluspaari.

1.2. PCR-reaktsioonisegu

Reaktiiv	Kogus reaktsiooni kohta	Lõppkontsentratsioon
Steriilne ultrapuhas vesi	17,65 µl	
10X PCR puhver ⁽¹⁾ (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
dNTP-segu (20 mM)	0,25 µl	0,2 mM
Praimer OLI-1 (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Praimer Y-2 (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Taq-polümeraas (5 U/µl) ⁽¹⁾	0,1 µl	0,5 U
Proovi maht	2,0 µl	
Kogumaht	25 µl	

⁽¹⁾ Meetod valideeriti, kasutades Perkin Elmeri (AmpliTaq) ja Gibco BRL Taq-polümeraasi.

1.3. PCR-reaktsiooni tingimused

Järgitakse järgmist menetlust:

- 1 tsükkel: i) 2 minutit 96 °C juures (maatriks-DNA denaturatsioon)
 35 tsükliit: ii) 20 sekundit 94 °C juures (maatriks-DNA denaturatsioon)
 iii) 20 sekundit 68 °C juures (praimerite anniilimine)
 iv) 30 sekundit 72 °C juures (koopia ekstensioon)
 1 tsükkel: v) 10 minutit 72 °C juures (lõplik ekstensioon)
 vi) hoitakse 4 °C juures.

Märkus: see programm optimeeriti termotsükleri Perkin Elmer 9600 kasutamiseks. Muude mudelite kasutamisel võib olla vaja muuta tsükliite ii, iii ja iv kestust.

1.4. Amplikoni restriksioonensüümi analüüs

Bakteri *R. solanacearum* DNAs amplifitseeritud PCR-produktid võivad ensüümiga *Ava* II anda tüüpilise pikkusega restriksioonifragmentide polümorfismi, kui neid on inkubeeritud 37 °C juures.

2. PCR-protokoll, Pastrik ja Maiss (2000)

2.1. Oligonukleotiidpraimerid

Päripidine praimer Ps-1 5'- agt cga acg gca gcg ggg g -3'

Äraspidine praimer Ps-2 5'- ggg gat ttc aca tcg gtc ttg ca -3'

Bakteri *R. solanacearum* maatriks-DNA eeldatav ampikonipikkus on 553 aluspaari.

2.2. PCR-reaktsioonisegu

Reaktiiv	Kogus reaktsiooni kohta	Lõppkontsentratsioon
Steriilne ultrapuhas vesi	16,025 µl	
10X PCR puhver (1)	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (fraktsioon V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
dNTP-segu (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Praimer Ps-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Praimer Ps-2 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Taq-polümeraas (5 U/µl) (1)	0,1 µl	0,5 U
Proovi maht	5,0 µl	
Kogumaht	25,0 µl	

(1) Meetodid valideeriti, kasutades Perkin Elmeri (AmpliTaq) ja Gibco BRL Taq-polümeraasi.

Märkus: Algselt optimeeritud kasutamiseks Gibco Taq-polümeraasiga termotsükleris MJ Research PTC 200.

Kasutada võib ka Perkin Elmer AmpliTaqi ja puhvrit samades kontsentratsioonides.

2.3. PCR-reaktsiooni tingimused

Järgitakse järgmist menetlust:

- 1 tsüklil: i) 5 minutit 95 °C juures (maatriks-DNA denaturatsioon)
- 35 tsükli: ii) 30 sekundit 95 °C juures (maatriks-DNA denaturatsioon)
- iii) 30 sekundit 68 °C juures (praimerite anniilimine)
- iv) 45 sekundit 72 °C juures (koopia ekstensioon)
- 1 tsüklil: v) 5 minutit 72 °C juures (lõplik ekstensioon)
- vi) hoitakse 4 °C juures.

Märkus: programm on optimeeritud kasutamiseks termotsükleriga MJ Research PTC 200. Muude mudelite kasutamisel võib olla vaja muuta tsükli ii, iii ja iv kestust.

2.4. Amplikoni restriksioonensüümi analüüs

Bakteri *R. solanacearum* DNAs amplifitseeritud PCR-produktid võivad ensüümiga Taq I anda tüüpilise pikkusega restriksioonifragmentide polümorfismi, kui neid on inkubeeritud 65 °C juures 30 minutit. Bakterile *R. solanacearum* tüüpilisest fragmendist saadud restriksioonifragmentide pikkus on 457 ja 96 aluspaari.

3. Mitmeetapiline PCR-protokoll sisemise PCR-kontrolliga (Pastrik et al., 2002)

3.1. Oligonukleotiidpraimerid

Päripidine praimer Rs-1-F 5'- ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA -3'

Äraspidine praimer Rs-1-R 5'- CCC AGT CAC GGC AGA GAC T -3'

Päripidine praimer Ns-5-F 5'- AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G -3'

Äraspidine praimer Ns-6-R 5'- GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC -3'

Bakteri *R. solanacearum* maatriks-DNA eeldatav ampikonipikkus on 718 aluspaari (Rs-praimerite kompleks)

18S rRNA sisemise PCR-kontrolli eeldatav ampikonipikkus on 310 aluspaari (Ns-praimerite kompleks)

3.2. PCR-reaktsioonisegu

Reaktiiv	Kogus reaktsiooni kohta	Lõppkontsentratsioon
Steriilne ultrapuhas vesi	12,625 µl	
10X PCR-puhver ⁽¹⁾ (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (fraktsioon V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
dNTP-segu (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Praimer Rs-1-F (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Praimer Rs-1-R (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Praimer Ns-5-F (10 µM) ⁽²⁾	0,15 µl	0,06 µM
Praimer Ns-6-F (10 µM) ⁽²⁾	0,15 µl	0,06 µM
Taq-polümeraas (5 U/µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1,0 U
Proovi maht	5,0 µl	
Kogumaht	25,0 µl	

⁽¹⁾ Meetodid valideeriti, kasutades Perkin Elmeri (AmpliTag) ja Gibco BRL Taq-polümeraasi.

⁽²⁾ Kartuli basaalse te tipusüdame ekstrakti puhul optimeeriti praimerite Ns-5-F ja Ns-6-R kontsentratsioonid, kasutades homogeemismetodeid ja DNA puhastamist vastavalt Pastrikule (2000) (vt VI jao punkt A.6.1.a). Kui kasutatakse loksutamise teel DNA ekstraheerimist või muid isoleerimismeetodeid, on vaja reaktiivikontsentratsioonid uuesti optimeerida.

3.3. PCR-reaktsiooni tingimused

Järgitakse järgmist menetlust:

- 1 tsükkel: i) 5 minutit 95 °C juures (maatriks-DNA denaturatsioon)
- 35 tsükli: ii) 30 sekundit 95 °C juures (maatriks-DNA denaturatsioon)
- iii) 30 sekundit 58 °C juures (praimerite anniilimine)
- iv) 45 sekundit 72 °C juures (koopia ekstensioon)
- 1 tsükkel: v) 5 minutit 72 °C juures (lõplik ekstensioon)
- vi) hoitakse 4 °C juures

Märkus: programm on optimeeritud kasutamiseks termotsükleriga MJ Research PTC 200. Muude mudelite kasutamisel võib olla vaja muuta tsükli ii, iii ja iv kestust.

3.4. Amplikoni restriksioonensüümi analüüs

Bakteri *R. solanacearum* DNAST amplifitseeritud PCR-produktid võivad ensüümiga Bsm I või isokisomeeriga (nt Mva 1269 I) anda tüüpilise pikkusega restriksioonifragmentide polümorfismi, kui neid on inkubeeritud 65 °C juures 30 minutit.

4. *R. solanacearum*'i biotüübispetsiifiline PCR-protokoll (Pastrik *et al.*, 2001)

4.1. Oligonukleotiidpraimerid

- Päripidine praimer Rs-1-F 5'- ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA -3'
- Äraspidine praimer Rs-1-R 5'- CCC AGT CAC GGC AGA GAC T -3'
- Äraspidine praimer Rs-3-R 5'- TTC ACG GCA AGA TCG CTC -3'

Bakteri *R. solanacearum* maatriks-DNA eeldatav ampikonipikkus:

praimeriga Rs-1-F/Rs-1-R on 718 aluspaari

praimeriga Rs-1-F/Rs-3-R on 716 aluspaari

4.2. PCR-reaktsioonisegu

a) Biotüübi 1/2 spetsiifiline PCR

Reaktiiv	Kogus reaktsiooni kohta	Lõppkontsentratsioon
Steriilne ultrapuhast vesi	12,925 µl	
10X PCR-puhver ⁽¹⁾	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (fraktsioon V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
dNTP-segu (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Praimer Rs-1-F (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Praimer Rs-1-R (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Taq-polümeraas (5 U/µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1 U
Proovi maht	5,0 µl	
Kogumaht	25,0 µl	

⁽¹⁾ Meetodid on valideeritud, kasutades Perkin Elmeri (AmpliTaQ) ja Gibco BRL Taq-polümeraasi.

b) Biotüübi 3/4/5 spetsiifiline PCR

Reaktiiv	Kogus reaktsiooni kohta	Lõppkontsentratsioon
Steriilne ultrapuhast vesi	14,925 µl	
10X PCR puhver ⁽¹⁾	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (fraktsioon V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
dNTP-segu (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Praimer Rs-1-F (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Praimer Rs-3-R (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Taq-polümeraas (5 U/µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1 U
Proovi maht	5,0 µl	
Kogumaht	25,0 µl	

⁽¹⁾ Meetodid on valideeritud, kasutades Perkin Elmeri (AmpliTaQ) ja Gibco BRL Taq-polümeraasi.

4.3. PCR-reaktsiooni tingimused

Nii biotüübi 1/2 kui ka 3/4/5 spetsiifiliste reaktsioonide puhul järgitakse järgmist menetlust:

- 1 tsüklil: i) 5 minutit 95 °C juures (maatriks-DNA denaturatsioon)
- 35 tsükli: ii) 30 sekundit 95 °C juures (maatriks-DNA denaturatsioon)
- iii) 30 sekundit 58 °C juures (praimerite anniilimine)
- iv) 45 sekundit 72 °C juures (koopia ekstensioon)
- 1 tsüklil: v) 5 minutit 72 °C juures (lõplik ekstensioon)
- vi) hoitakse 4 °C juures

Märkus: programm optimeeriti kasutamiseks termotsükleriga MJ Research PTC 200. Muude mudelite kasutamisel võib olla vaja muuta tsükli ii, iii ja iv kestust.

4.4. Amplikoni restriksioonensüümi analüüs

Bakteri *R. solanacearum* DNAs praaimeritega Rs-1-F ja Rs-1-R amplifitseeritud PCR-produktid võivad ensüümiga *Bsm* I või isokisomeeriga (nt *Mva* I 269 I) anda tüüpilise pikkusega restriksioonifragmentide polümorfismi, kui neid on inkubeeritud 65 °C juures 30 minutit. Bakteri *R. solanacearum* DNAs praaimeritega Rs-1-F ja Rs-3-R amplifitseeritud PCR-produktidel ei ole restriksioonikohti.

5. Täitepuhvri valmistamine5.1. Bromofenoolsinine (10 % **põhilahus**)

Bromofenoolsinine	5 g
Kaks korda destilleeritud vesi	50 ml

5.2. Täitepuhver

Glütserool (86 %)	3,5 ml
Bromofenoolsinine (5.1)	300 µl
Kaks korda destilleeritud vesi	6,2 ml

6. 10 X trisatsetaat EDTA puhver, pH 8,0

Tris-puhver	48,40 g
Jää-äädikas	11,42 ml
EDTA (dinaatriumsool)	3,72 g
Destilleeritud vesi	1,00 l

Enne kasutamist lahjendatakse üks kord.

On ka müügil (näiteks Invitrogen või samaväärne).

7. liide

FISH-analüüsi valideeritud reaktiivid

1. Oligoproovid

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

Mittespetsiifiline eubakteriaalne oligoproov EUB-338-FITC 5'- gct gcc tcc cgt agg agt-3'

2. Kinnitilahus

(HOIATUS! KINNITI SISALDAB PARAFORMALDEHÜÜDI, MIS ON MÜRGINE. TULEB KANDA KINDAID, AINET EI TOHI SISSE HINGATA. ON SOOVITAV TÖÖTADA TÕMBEKAPIS.)

- i) 9 ml molekulaarbioloogias kasutatavat vett (näiteks ultrapuhast vett) kuumutatakse umbes 60 °C ja lisatakse 0,4 g paraformaldehüüdi. Paraformaldehüüd lahustub pärast seda, kui on lisatud 5 tilka 1N NaOH ja segatud magnetsegajaga.
- ii) pH reguleeritakse 7,0, lisades 1 ml 0,1 M fosfaatpuhvrit (PB; pH 7,0) ja 5 tilka 1N HCl. pH-d kontrollitakse indikaatorribadega ja vajaduse korral reguleeritakse HCl või NaOH-ga. (HOIATUS! PARAFORMALDEHÜÜDI LAHUSTE PÜHUL EI TOHI KASUTADA PH-MEETRIT.)
- iii) Lahus filtreeritakse läbi 0,22 µm membraanfiltrit ja säilitatakse edasiseks kasutamiseks tolmuvabalt 4 °C juures.

3. 3 X Hybmix-lahus

NaCl	2,7 M
Tris-HCl	60 mM (pH 7,4)
EDTA (filter-steriliseeritud ja autoklaavitud)	15 mM

Lahjendatakse üks kord vastavalt vajadusele.

4. Hübridisatsioonilahus

1 X Hybmix-lahus

Naatriumdodetsüülsulfaat	0,01 %
Formamiid	30 %
Oligoproov EUB 338	5 ng/µl
Oligoproov OLI-1 või OLI-2	5 ng/µl

Hübridisatsioonilahused valmistatakse vastavalt tabelis 1 arvatud kogustele. Iga objektiklaasi jaoks (millel on kaks erinevat proovi kaks korda) on tarvis 90 µl hübridisatsioonilahust. TÄHTIS! FORMAMIID ON VÄGA MÜRGINE, SEETÖTTU TULEB KANDA KINDAID JA RAKENDADA VAJALIKKE ETTEVAATUSABINÖUSID!

Tabel. Hübridisatsioonisegu valmistamiseks soovitatavad kogused

Objektiklaaside hulk	1	4	6	8	10
Steriilne ultrapuhast vesi	23,1	92,4	138,6	184,8	231,0
3 X Hybmix-lahus	30,0	120,0	180,0	240,0	300,0
1 % SDS	0,9	3,6	5,4	7,2	9,0
Formamiid	27,0	108,0	162,0	216,0	270,0
Oligoproov EUB 338 (100 ng/µl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Oligoproov OLI-1 või OLI-2 (100 ng/µl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Kogumaht (µl)	90,0	360,0	540,0	720,0	900,0

Märkus: kõiki valgustundlikke oligoproove sisaldavaid lahuseid säilitatakse pimedas – 20 °C juures. Kasutamise ajal välditakse otsest päikese- või elektrivalgust.

5. 0,1 M fosfaatpuhver, pH 7,0

Na ₂ HPO ₄	8,52 g
KH ₂ PO ₄	5,44 g
Destilleeritud vesi	1,00 l

Ained lahustatakse, kontrollitakse pH ja steriliseeritakse autoklaavis 121 °C juures 15 minutit.

8. liide

Baklažaani- ja tomatikultuuride kasvatamistingimused

Tomati (*Lycopersicon esculentum*) või baklažaani (*Solanum melongena*) seemned külvatakse pastöriseeritud külvikomposti. Täielikult avanenud idulehtedega (10–14 päeva) seemikud istutatakse ümber pastöriseeritud istutuskomposti.

Baklažaani- või tomatitaimed peaksid olema kasvatatud kasvuhoones järgmistel keskkonnatingimustel:

päeva pikkus:	14 tundi või looduslik päevapikkus, kui see on pikem,
temperatuur:	päeval: 21–24 °C, öösel: 14–18 °C.
Haigusele vastuvõtlik tomatisort:	“Moneymaker”
Haigusele vastuvõtlik baklažaanisort:	“Black Beauty”
Tarnijad:	vt veebileht http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main .

VIITED

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

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

III LISA

1. Iga haigusetikitaja esinemise kahtluse korral, mille kohta on saadud loetletud taimse materjali või muu materjali kohta positiivne tulemus vastavalt III lisas esitatud asjakohasele meetodile läbi viidud sõelkatse(te)s ja oodatakse tulemuste kinnitamist või ümberlukkamist, tuleb kuni eespool nimetatud meetodi lõpuleviimiseni kinni pidada ja nõuetekohaselt säilitada

- kõik mugulad, millest proov on võetud, ning võimaluse korral kõik taimed, millelt proov on võetud,
- kõik järelejäänud ekstraktid ja sõelkatse(te)ks valmistatud lisamaterjalid, nt immunofluorestsents-objektiklaasid, ning
- kõik asjakohased dokumendid kuni kõnealus(t)e meetodi(te) lõpuleviimiseni.

Mugulate säilitamine võimaldab teha sordikatseid, kui see on asjakohane.

2. Organismi olemasolu kinnituse puhul tuleks alles hoida ja nõuetekohaselt säilitada

- lõikes 1 määratletud materjal,
- ja
- vajaduse korral mugula- või taimeekstraktiga nakatatud tomati- või baklažaanitaimede proov ning
- organismi isoleeritud kultuur

vähemalt ühe kuu jooksul pärast teatamist vastavalt artikli 5 lõikele 2.

IV LISA

Artikli 5 lõike 1 punkti a alapunktis i osutatud uurimisel võetakse vajaduse korral arvesse järgmised tegurid:

- i) tootmiskohad,
- kus kasvatatakse või on kasvatatud kartuleid, mis pärinevad samast kloonist kui kartulid, mis on osutunud organismiga saastunuks,
 - kus kasvatatakse või on kasvatatud tomateid, mis pärinevad samast algallikast kui tomatid, mis on osutunud organismiga saastunuks,
 - kus kasvatatakse või on kasvatatud kartuleid või tomateid, mis on ametliku kontrolli all organismi oletatava esinemise tõttu,
 - kus kasvatatakse või on kasvatatud kartuleid, mis pärinevad samast kloonist kui kartulid, mis on kasvatatud organismiga saastunuks osutunud tootmiskohtades,
 - kus kasvatatakse kartuleid või tomateid ja mis asetsevad saastunud tootmiskoha naabruses, k.a sellised tootmiskohad, kus tootmisseedmeid ja -rajatise jagatakse omavahel otseselt või ühise lepingulise tööttevõtja kaudu,
 - kus kastmiseks või niisutamiseks kasutatakse pinnavett, mille lähtekohas on organismi esinemine kinnitatud või milles oletatakse organismi esinemist,
 - kus kastmiseks või niisutamiseks kasutatakse pinnavett, mille lähtekoht on ühises kasutuses tootmiskohtadega, kus on organismi esinemine kinnitatud või kus oletatakse organismi esinemist,
 - mis on või mis on olnud üle ujutatud pinnaveega, milles on organismi esinemine kinnitatud või milles oletatakse organismi esinemist,
- ja
- ii) organismiga saastunud pinnavesi, mida on kasutatud tootmiskoha kastmiseks ja niisutamiseks või mis on üle ujutanud põllu(d) või tootmiskoha(d).
-

V LISA

1. Tõenäolise saastumise ulatuse kindlaksmääramiseks artikli 5 lõike 1 punkti a alapunkti iii ja punkti 5 lõike 1 punkti c alapunkti iii alusel võetakse vajaduse korral arvesse järgmisi tegureid:
 - artikli 5 lõike 1 punkti a alapunkti ii alusel saastunuks tunnistatud tootmiskohas kasvatatav loetletud taimne materjal,
 - tootmiskoht või -kohad, mis mõnes tootmislüüsis on seotud artikli 5 lõike 1 punkti a alapunkti ii alusel saastunuks tunnistatud loetletud taimse materjaliga, k.a tootmiskohad, kus tootmisseedmeid ja -rajatise jagatakse omavahel otseselt või ühise lepingulise tööettevõtja kaudu,
 - loetletud taimne materjal, mida kasvatati või mis oli eelmises taandes osutatud tootmiskohas või -kohtades ajavahemikul, mil esimeses taandes osutatud tootmiskohas oli vastavalt artikli 5 lõike 1 punkti a alapunktile ii saastunuks tunnistatud taimne materjal,
 - eelmistes taantes osutatud tootmiskohtadest pärit loetletud taimset materjali käitlevad ettevõtted,
 - mis tahes seadmed, veokid, anumad, laod või nende osad ning mis tahes muud objektid, sealhulgas pakkematerjal, mis on võinud olla kontaktis loetletud taimse materjaliga, mis on tunnistatud saastunuks artikli 5 lõike 1 punkti a alapunkti ii alusel,
 - kogu loetletud taimne materjal, mida on hoitud eelmises taandes loetletud ehitiste või objektide sees või nendega kokkupuutes enne nende ehitiste või objektide puhastamist ja desinfitseerimist,
 - artikli 5 lõike 1 punkti a alapunkti i alusel toimunud uurimise ja laboratoorse analüüsime tulemusel artikli 5 lõike 1 punkti a alapunkti ii alusel organismiga saastunuks tunnistatud loetletud taimse materjaliga samast klooni pärinevad kartulimugulad või -taimed ja saastunuks tunnistatud taimse materjaliga samast allikast pärinevad tomatitaimed, mille saastumine on tõenäoline taime klooni kaudu, kuigi analüüsi tulemused on võinud olla negatiivsed. Saastunud ja klooni kaudu seotud mugulate või taimede suguluse tõendamiseks võib teha sordikatseid,
 - eelmises taandes osutatud taimse materjali tootmiskoht või -kohad,
 - loetletud taimse materjali tootmiskoht või -kohad, kus kasutatakse artikli 5 lõike 1 punkti c alapunkti ii alusel organismiga saastunuks osutunud kastmis- ja niisutusvett,
 - loetletud taimne materjal, mis on kasvatatud põldudel, mis on üle ujutatud saastunud pinnaveega.
2. Organismi võimaliku leviku kindlaksmääramine artikli 5 lõike 1 punkti a alapunkti iv ja artikli 5 lõike 1 punkti c alapunkti iii alusel hõlmab
 - i) artikli 5 lõike 1 punkti a alapunktis iv osutatud juhtudel
 - loetletud taimse materjali muude tootmiskohtade lähedust,
 - seemnekartulivarude ühist tootmist ja kasutamist,
 - tootmiskohti, kus kasutatakse pinnavett taimse materjali kastmiseks või niisutamiseks juhtudel, kus artikli 5 lõike 1 punkti a alapunkti ii alusel organismiga saastunuks osutunud tootmiskohas (tootmiskohtades) esineb või on esinenud pinnavee äravoolu või üleujutuse ohtu;

- ii) juhtudel, mil pinnavesi on artikli 5 lõike 1 punkti c alapunkti ii alusel tunnistatud organismiga saastunuks,
 - loetletud taimse materjali tootmiskohta (tootmiskohti), mis asuvad organismiga saastunuks tunnistatud pinnavee lähedal või kus esineb ülejutusohht,
 - iga eraldatud vesikonda, mis on ühenduses saastunuks tunnistatud pinnaveega,
 - veekogud, mis on ühenduses saastunuks tunnistatud pinnaveega, võttes arvesse
 - saastunuks tunnistatud vee voolusuunda ja -hulka,
 - looduslike maavitsaliste peremeestaimede esinemist.

3. Artikli 5 lõike 2 esimeses lõigus osutatud teatis esitatakse järgmiselt:

- kohe pärast organismi olemasolu kinnitamist laborianalüüsidega, kasutades II lisas sätestatud meetodeid, esitades vähemalt järgmised andmed:
 - kartulite puhul,
 - a) partii sordi nimi;
 - b) kasutusotstarve (söögikartul, seemnekartul jne) ja seemnekartuli kategooria, kui see on kohaldatav,
 - tomatitaimede puhul partii sordi nimi ja kategooria, kui see on kohaldatav,
- ilma et see piiraks artikli 4 punkti 3 esinemise kahtluse teatamise nõudeid, peab asjaomane liikmesriik, kus saastumine on avastatud ja on olemas teisest liikmesriigist (teistest liikmesriikidest) pärit või teise liikmesriiki (teistesse liikmesriikidesse) viidava loetletud taimse materjali saastumisoht, viivitamata teatama asjassepuutuvale liikmesriigile (asjassepuutuvatele liikmesriikidele) artikli 5 lõike 3 kohaselt järgmised andmed:
 - a) kartuli- või tomatipartii sordi nimi;
 - b) kaubasaatja ja kaubasaaja nimi ja aadress;
 - c) kartuli- või tomatipartii tarnekuupäev;
 - d) tarnitud kartuli- või tomatipartii suurus;
 - e) taimepassi koopia või vähemalt taimepassi number, kui see on asjakohane, või kasvataja või turustaja registreerimisnumber, kui see on asjakohane, ja saatedokumendi koopia.

Kui sellist teavet esitatakse, teatatakse sellest viivitamata komisjonile.

4. Artikli 5 lõike 2 teises lõigus osutatud lisateave esitatakse järgmiselt:

pärast kõigi uuringute lõppu teatatakse iga juhtumi puhul järgmised andmed:

- a) kuupäev, millal saastumine kinnitati;
- b) lühikirjeldus tehtud uurimisest saasteallika kindlaksmääramise ja saastumise võimaliku leviku kohta, sealhulgas läbiviidud proovivõtu taseme kohta;
- c) teave kindlakstehtud või oletatava(te) saasteallika(te) kohta;
- d) täpne teave saastunuks tunnistamise ulatuse kohta, sealhulgas tootmiskohtade arv ja kartulite korral partiide arv koos sordi nime ja seemnekartuli puhul kategooriaga;

- e) üksikasjad tsooni piiritlemise kohta, sealhulgas nende tootmiskohtade arv, mis ei ole tunnustatud saastunuks, kuid mida tsoon hõlmab;
 - f) üksikasjad veealade saastunuks tunnistamise kohta, sealhulgas veekogu nimi ja asukoht ning saastumuse/niisutamiskeelu ulatus;
 - g) saastunuks tunnustatud tomatitaimede saadetise või partii puhul direktiivi 2000/29/EÜ artikli 13 lõike 1 alapunktis ii ette nähtud sertifikaadid ning vastavalt direktiivi 2000/29/EÜ V lisa A osa 1 jao punktis 2.2 esitatud loetelule väljastatud taimepassi number;
 - h) muud teavet, mis on seotud kinnitatud haiguspuhanguga (haiguspuhangutega) ja mida komisjon võib nõuda.
-

VI LISA

1. Artikli 6 punktis 1 osutatud sätted on järgmised:

- loomasöödana kasutamine pärast kuuntöötlemist, nii et puudub organismi ellujäämise oht,
või
- kõrvaldamine ametlikult heaks kiidetud jäätmekäitluskohas, kus ei teki organismi keskkonda pääsemise identifitseeritavat riski nt põllumajandusmaadesse imbumise või põllumaa kastmiseks kasutatava veega kokkupuutumise kaudu,
või
- tuhastamine
või
- tööstuslikuks töötlemiseks kasutamine otsese ja vahetu tarnimisega töötlevasse tehasesse, kus on ametlikult heaks kiidetud jäätmete kõrvaldamise seadmed, mille puhul on kindlaks tehtud, et ei ole organismi leviku identifitseeritavat ohtu, ning vähemalt väljuvate sõidukite puhastamis- ja desinfitseerimissüsteem,
või
- muud meetmed, tingimusel et on kindlaks tehtud, et ei ole organismi leviku identifitseeritavat ohtu; sellistest meetmetest ja nende põhjendustest tuleb teatada komisjonile ja teistele liikmesriikidele.

Mis tahes muud jäätmed, mis on seotud eespool nimetatud tingimustega või mis tekivad nende tõttu, kõrvaldatakse ametlikult heaks kiidetud meetoditel vastavalt käesoleva direktiivi VII lisale.

2. Artikli 6 lõikes 2 osutatud loetletud taimse materjali asjakohane kasutamine või kõrvaldamine vastava liikmesriigi (vastavate liikmesriikide) vastutavate ametiasutuste kontrolli all koos vastutavate ametiasutuste vahelise teabevahetusega, et tagada pidev kontroll ja selle liikmesriigi vastutavate ametiasutuste heakskiit, kus kartulid pakendatakse või kus neid töödeldakse esimeses ja teises taandes osutatud jäätmete kõrvaldamise seadmete jaoks, on järgmine:

i) kartulimugulate puhul

- kasutamine toiduks ette nähtud tarbekartulina, mis on valmis pakendatud otsetarnimiseks ja kasutamiseks ümberpakendamata kohas, kus on asjakohased jäätmete kõrvaldamise seadmed. Seemnekartuliks ette nähtud kartuleid võib töödelda samas kohas ainult siis, kui seda tehakse eraldi või pärast puhastamist ja desinfitseerimist,
või
- kasutamine tööstuslikuks töötlemiseks ette nähtud tarbekartulina, mis tuleb otse ja vahetult tarnida töötlemisettevõttesse, kus on nõuetekohased jäätmete kõrvaldamisseadmed ja vähemalt lahkvate sõidukite puhastamis- ja desinfitseerimissüsteem,
või
- muu kasutamine või kõrvaldamine, tingimusel et ei esine organismi leviku identifitseeritavat ohtu ning selle on heaks kiitnud kõnealused vastutavad ametiasutused;

ii) teiste taimeosade, k.a varre- ja leheprahi puhul,

- hävitamine
või
- muu kasutamine või kõrvaldamine, tingimusel et ei esine organismi leviku identifitseeritavat ohtu; ning selle on heaks kiitnud kõnealused vastutavad ametiasutused.

3. Artikli 6 lõikes 3 osutatud objektide saastumisest puhastamise asjakohased meetodid on puhastamine ja vajaduse korral desinfitseerimine nii, et ei ole organismi leviku identifitseeritavat ohtu, ning seda tehakse liikmesriikide vastutavate ametiasutuste järelevalve all.
4. Liikmesriikide rakendatavad meetmed artikli 5 lõike 1 punkti a alapunktis iv ja punkti c alapunktis iii kehtestatud ja artikli 6 lõikes 4 osutatud piiritletud tsooni(de)s on järgmised.
- 4.1. Nendel juhtudel, kui tootmiskohad on tunnistatud organismiga saastunuks artikli 5 lõike 1 punkti a alapunkti ii alusel
- a) kaitstud tootmisalade põldudel või põlluosadel, mis on tunnistatud saastunuks artikli 5 lõike 1 punkti a alapunkti ii alusel
- i) vähemalt nelja kasvusaasta jooksul pärast saastunuks tunnistamise aastat,
- võetakse meetmed iseeneslikult kasvama läinud kartuli- ja tomatitaimede ja muude organismi peremeestaimede, sh maavitsaliste sugukonda kuuluvate umbrohtude kõrvaldamiseks
- ning
- ei panda maha, istutata ega külvata järgmist:
 - kartulimugulaid, -taimi ega -seemneid,
 - tomatitaimi ega -seemneid,
 - võttes arvesse organismi bioloogiat,
 - teisi organismi peremeestaimi,
 - taimeliike perekonnast kapsasrohi *Brassica*, mille puhul on identifitseeritav organismi ellujäämise oht,
 - teisi põllukultuure, millel on identifitseeritav organismi levitamise oht,
 - esimesel kartuli või tomati kasvusaatal, mis järgneb eelmises taandes määratletud ajavahemikule, ja tingimusel, et põld on vähemalt kahel järjestikusel kasvusaatal enne taimede istutamist olnud ametliku kontrolli ajal vaba iseeneslikult kasvama läinud kartuli- ja tomatitaimedest ja muudest peremeestaimedest, sh maavitsaliste sugukonda kuuluvatest umbrohtudest, tuleb
 - kartuli puhul lubada vaid tarbekartuli tootmist,
 - kartuli ja tomati puhul analüüsida vastavalt koristatud mugulaid või tomatitaimi II lisas esitatud menetluse kohaselt,
 - hooajal, mis järgneb eelmises taandes osutatud kartuli- või tomatikasvatushooajale ja asjakohasele külvikordade tsüklile (mis seemnekartuli kasvatamise puhul on vähemalt kaks aastat), viia läbi artikli 2 lõikes 1 määratletud ametlik kontroll,
- või
- ii) saastunuks tunnistamise aastale järgneva viie kasvusaasta jooksul
- võetakse meetmed iseeneslikult kasvama läinud kartuli- ja tomatitaimede ja muude organismi looduslikult esinevate peremeestaimede, sh maavitsaliste sugukonda kuuluvate umbrohtude kõrvaldamiseks
- ning
- tuleb esimese kolme aasta jooksul põld vastavalt identifitseeritavale ohule kas sööti jätta või külvata sinna teravilja või kasutada püsikarjamaana, mida sagedasti madalalt niidetakse või kasutatakse intensiivselt karjatamiseks, või kasutada heintaimede seemne tootmiseks ja kahe järgneva aasta jooksul järgneb muude kui organismi peremeestaimede kasvatamine, mille puhul ei ole organismi ellujäämise või leviku identifitseeritavat ohtu,

- esimesel kartuli või tomati kasvuaastal, mis järgneb eelmises taandes määratletud ajavahemikule, ja tingimusel, et põld on vähemalt kahel järjestikusel kasvuaastal enne taimede istutamist olnud ametliku kontrolli ajal vaba iseeneslikult kasvama läinud kartuli- ja tomatitaimedest ja muudest peremeestaimedest, sh maavitsaliste sugukonda kuuluvatest umbrohtudest, tuleb
 - kartuli puhul lubada seemne- või tarbekartuli tootmist,
 - kartuli ja tomati puhul analüüsida vastavalt koristatud mugulaid või tomatitaimi vastavalt II lisas esitatud menetlusele;
- b) kõigil muudel saastunud tootmiskoha põldudel ning tingimusel, et vastutavad ametiasutused on kindlaks teinud, et iseeneslikult kasvama läinud kartuli- ja tomatitaimede ja muude organismi looduslikult esinevate peremeestaimede, sealhulgas maavitsaliste sugukonda kuuluvate umbrohtude oht on kõrvaldatud,
 - tootmiskoha saastunuks tunnistamise aastale järgneval kasvusaastal
 - kartulimugulaid, -taimi või seemneid ega muid organismi peremeestaimi ei panda maha, istutata ega külvata,
 - või
 - kartulimugulate puhul tohib sertifitseeritud seemnekartulit kasutada üksnes tarbekartuli tootmiseks,
 - tomatitaimede puhul võib direktiivi 2000/29/EÜ nõuetele vastavast seemnest kasvatatud tomatitaimi kasutada üksnes viljade tootmiseks,
 - saastunuks tunnistamise aastale järgneval teisel kasvusaastal
 - kartulite puhul kasutatakse seemne- või tarbekartuli tootmiseks üksnes sertifitseeritud seemnekartulit või seemnekartulit, mida on pruunmädaniku puudumise suhtes ametlikult analüüsitud ning mis on kasvatatud ametliku kontrolli all muudes kui artiklis 4.1 osutatud tootmiskohtades,
 - tomatite puhul kasutatakse nii taimede kui ka viljade tootmiseks üksnes tomatitaimi, mis on kasvatatud direktiivi 2000/29/EÜ nõuetele vastavast seemnest või, vegetatiivse paljundusviisi puhul, toodetud niisugusest seemnest saadud taimedest ja kasvatatud ametliku kontrolli all muudes kui artiklis 4.1 osutatud tootmiskohtades,
 - saastunuks tunnistamise aastale järgneval vähemalt kolmandal kasvusaastal
 - kartulite puhul kasutatakse nii seemne- kui ka tarbekartuli tootmiseks üksnes sertifitseeritud seemnekartulit või sertifitseeritud seemnekartulist ametliku kontrolli all kasvatatud seemnekartulit,
 - tomatite puhul kasutatakse nii taimede kui ka viljade tootmiseks üksnes tomatitaimi, mis on kasvatatud direktiivi 2000/29/EÜ nõuetele vastavast seemnest, või niisugustest taimedest ametliku kontrolli all kasvatatud taimi,
 - kõigil eelmistes taanetes viidatud kasvusaastatel võetakse meetmed iseeneslikult kasvama läinud kartuli- ja tomatitaimede ja muude organismi looduslikult esinevate peremeestaimede kõrvaldamiseks, kui neid esineb, ning viiakse sobival ajal läbi kasvavate taimede ametlik kontroll, samuti tehakse kartuli puhul koristatud mugulate ametlik analüüsimine vastavalt II lisas esitatud menetlusele;
- c) viivitamata pärast saastunuks tunnistamist vastavalt artikli 5 lõike 1 punkti a alapunktile ii ning pärast esimest sellele järgnevat kasvuaastat,
 - kõik tootmiskohas ja kartuli- või tomatikasvatusel kasutatud masinad ja ladustamisrajatised puhastatakse ning vajaduse korral desinfitseeritakse, kasutades nõuetekohaseid meetodeid, mida on kirjeldatud punktis 3,
 - ametlikult kontrollitakse kastmis- ja niisutamiskavasid ning vajaduse korral need keelatakse, et vältida organismi levikut;

- d) artikli 5 lõike 1 punkti a alapunkti ii alusel saastunuks tunnistatud kaitstud tootmisala osal, kus on võimalik kasvusubstraadi täielik vahetus,

- on kartulimugulate, -taimede ja -seemnete või muude organismi peremeestaimede, sh tomatitaimede ja -seemnete mahapanek, istutamine või külvamine lubatud, kui tootmisala osal on kehtestatud ametlikud järelevõetavad meetmed organismi kõrvaldamiseks ja kõikide organismi peremeestaimede kõrvaldamiseks, sh täielikuks kasvusubstraadi vahetamiseks ja kõnealuse tootmisala osa ja kõikide seadmete põhjalikuks puhastamiseks ning vajaduse korral desinfitseerimiseks, ning millel seejärel on vastutavad ametiasutused lubanud toota kartuleid või tomateid,

ning

- kasvatatakse kartuleid sertifitseeritud seemnekartulist või minimugulatest või mikrotaimedest, mis pärinevad kontrollitud allikatest,
- kasvatatakse tomateid direktiivi 2000/29/EÜ nõuetele vastavast seemnest või, vegetatiivse paljundusviisi puhul, niisugusest seemnest saadud ja ametliku kontrolli all kasvatatud taimedest,
- kontrollitakse ametlikult kastmis- ja niisutamiskavasid ning vajaduse korral need keelatakse, et vältida organismi levikut.

4.2. Ilma et see piiraks punktis 4.1 määratletud meetmeid, peavad liikmesriigid piiritletud tsoonis

- a) tagama, et vahetult pärast saastunuks tunnistamist kõik niisuguste kartuli- või tomatikasvatusevõtete masinad ja ladustamiseseadmed nõuetekohaselt puhastatakse ja desinfitseeritakse, kasutades punktis 3 määratletud asjakohaseid meetodeid;

- b) viivitamata ja vähemalt kolme kasvatushooaja jooksul pärast saastunuks tunnistamist

- ba) juhtudel, kui piiritletud tsoon on kindlaks määratud artikli 5 lõike 1 punkti a alapunkti iv alusel,

- tagama oma vastutavate ametiasutuste järelevalve kartulimugulate või tomatite kasvatus-, ladustamis- või käitlemisettevõtetes ning ettevõtetes, kus kasutatakse kartuli- või tomatikasvatuseadmeid lepingu alusel,
- nõudma selles tsoonis kartuli tootmiseks ainult sertifitseeritud seemnekartuli või sellise seemnekartuli mahapanemist, mida on kasvatatud ametliku kontrolli all, ning pärast saagikoristust selle seemnekartuli analüüsimist, mis on kasvatatud artikli 5 lõike 1 punkti a alapunktile iii alusel tõenäoliselt saastunuks tunnistatud kohtades,
- nõudma koristatud seemnekartuli varude tarbekartulist eraldi käitlemist kõikides ettevõtetes selles tsoonis või seemnekartuli ja tarbekartuli käitlemise vahel puhastamist ja vajaduse korral desinfitseerimist,
- nõudma, et kõnealuses tsoonis istutataks kogu saagi saamiseks üksnes selliseid tomatitaimi, mis on kasvatatud direktiivi 2000/29/EÜ nõuetele vastavast seemnest või, vegetatiivse paljundusviisi puhul, toodetud niisugusest seemnest saadud taimedest ja kasvatatud ametliku kontrolli all,
- viima läbi artikli 2 lõikes 1 määratletud ametliku seire;

- bb) juhtudel, kui pinnavesi on saastunuks tunnistatud artikli 5 lõike 1 punkti c alapunkti ii alusel või on organismi võimaliku leviku allikaks vastavalt V lisa punktile 2,

- viima läbi iga-aastase seire asjakohasel ajal, sh proovide võtmise pinnaveest ja vastavatest organismi maavitsalistest peremeestaimedest, mis on seotud vastavate veeallikatega, ja tegema analüüsid kooskõlas II lisa sätestatud asjakohaste meetoditega loetletud taimematerjali puhul ja muudel juhtudel,

- kehtestama kastmis- ja niisutuskavade ametliku kontrolli, sh keelama saastunuks tunnistatud vee kasutamise loetletud taimse materjali ja vajaduse korral muude peremeestaimede kastmiseks ja niisutamiseks, et vältida organismi levikut. Selle keelu võib uuesti läbi vaadata, toetudes iga-aastasel seirel saadud tulemustele ning tühistamisotsustele, kui vastutavad ametiasutused leiavad, et pinnavesi ei ole enam saastunud. Keelu all olevat vett võib ametliku kontrolli all kasutada peremeestaimede kastmiseks ja niisutamiseks, kui kasutatakse ametlikult heaks kiidetud meetodeid, mis kõrvaldavad organismi ja väldivad tema levikut,
 - juhtudel, kui vedelate jäätmete äravoolukohad on saastunud, tuleb kehtestada ametlik kontroll loetletud taimset materjali kasutava töötleva tööstuse või pakendamiskohtade tahkete või vedelate jäätmete kõrvaldamiseks;
- c) kehtestama vajaduse korral kava kõikide seemnekartulivarude asendamiseks asjakohase ajavahemiku jooksul.

VII LISA

Ametlikult heaks kiidetud jäätmete kõrvaldamise meetodid, millele on osutatud VI lisa lõike 1 neljandas taandes, peavad organismi levikuohu vältimiseks vastama järgmistele tingimustele:

- i) kartulite ja tomatite töötlemisjäätmel (sh väljapraagitud kartulid, kartulikoored ja tomatid) ning muud kartulite ja tomatitega seotud tahked jäätmel (sh pinnas, kivid ja muu prügi) tuleb kas
- kõrvaldada ametlikult heaks kiidetud jäätmekäitluskohas, kus ei teki organismi keskkonda pääsemise identifitseeritavat riski nt põllumajandusmaasse imbumise või põllumaa kastmiseks kasutatava veega kokkupuutumise kaudu. Jäätmel tuleb toimetada otse jäätmekäitluskohta sellistes isoleeritud tingimustes, et ei ole ohtu jäätmete kadumiseks,
 - või
 - tuhastada
 - või
 - kõrvaldada muid meetmeid kasutades, tingimusel et on kindlaks tehtud, et ei ole organismi leviku identifitseeritavat ohtu; sellistest meetmetest ja nende põhjustest tuleb teatada komisjonile ja teistele liikmesriikidele;
- ii) vedelad jäätmel: enne äravoolu tuleb hõljuvaineid sisaldavad vedelad jäätmel filtreerida või setitada selliste ainete eemaldamiseks. Need ained tuleb kõrvaldada vastavalt lõigus i sätestatule.

Vedelad jäätmel tuleb seejärel kas

- enne kõrvaldamist kuumutada vähemalt temperatuurini 60 °C vähemalt 30 minuti jooksul
- või
- kõrvaldada muul ametlikult heaks kiidetud viisil ja ametliku järelevalve all, nii et ei ole identifitseeritavat riski jäätmete kokkupuuteks põllumajandusmaaga või veega, mida võidakse kasutada põllumajandusmaade kastmiseks. Nende meetmete üksikasjadest teavitatakse teisi liikmesriike ja komisjoni.

Käesolevas lisas kirjeldatud võimalusi kohaldatakse ka saastunud partiide käitlemise, kõrvaldamise ja töötlemisega seotud jäätmete suhtes.”