Šis dokumentas yra skirtas tik informacijai, ir institucijos nėra teisiškai atsakingos už jo turinį

►**B**

TARYBOS DIREKTYVA 93/85/EEB

1993 m. spalio 4 d.

dėl bulvių žiedinio puvinio kontrolės

(OL L 259, 18.10.1993, p. 1)

iš dalies keičiamas:

		Oficialusis leidinys		
		Nr.	puslapis	data
►**M1**	Komisijos direktyva 2006/56/EB 2006 m. birželio 18 d.	L 182	1	4.7.2006

▼B

TARYBOS DIREKTYVA 93/85/EEB

1993 m. spalio 4 d.

dėl bulvių žiedinio puvinio kontrolės

EUROPOS BENDRIJŲ TARYBA,

atsižvelgdama į Europos bendrijos steigimo sutartį, ypač į jos 43 straipsnį,

atsižvelgdama į Komisijos pasiūlymą ([1]),

atsižvelgdama į Europos Parlamento nuomonę ([2]),

atsižvelgdama į Ekonomikos ir socialinių reikalų komiteto nuomonę ([3]),

kadangi bulvių auginimas užima svarbią vietą Bendrijos žemės ūkyje; kadangi bulvių derliui grėsmę nuolat kelia kenksmingi organizmai;

kadangi, apsaugant bulvių augalus nuo tokių kenksmingų organizmų, ne tik bus išlaikytas gamybinis našumas, bet ir padidės žemės ūkio produktyvumas;

kadangi apsaugos priemonės, kuriomis siekiama, kad kenksmingi organizmai nepatektų į valstybės narės teritoriją, turės tiktai ribotą poveikį, jeigu tokie kenksmingi organizmai tuo patmetu ir metodiškai nebus kontroliuojami visoje Bendrijoje ir nebus užkirstas kelias jiems išplisti;

kadangi vienas iš kenksmingų organizmų bulvėse yra *Clavibacter michiganensis (Smith) Davis et al. ssp.sepedonicus (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al.,* patogeninis bulvių žiedinio puvinio ligos sukėlėjas; kadangi ši liga buvo užregistruota kai kuriose Bendrijos vietose ir tam tikrų ribotų ligos židinių vis dar esama;

kadangi visoje Bendrijoje išlieka gana didelis pavojus bulvių pasėliams, jeigu nebus imtasi veiksmingų priemonių aptikti šią ligą ir nustatyti jos išplitimą, užkirsti kelią jai atsirasti ir išplisti, o ją aptikus – užkirsti kelią jos plitimui ir kontroliuoti, siekiant ją išnaikinti;

kadangi, to siekiant, Bendrijoje reikia imtis tam tikrų priemonių; kadangi be to, jeigu reikia, valstybės narės privalo imtis papildomų arba griežtesnių priemonių, su sąlyga, kad nebus trukdoma bulvių siuntų judėjimui Bendrijoje, išskyrus atvejus, numatytus 1976 m. gruodžio 21 d. Tarybos direktyvoje 77/93/EEB dėl apsaugos priemonių, skirtų apsisaugoti nuo augalams arba augaliniams produktams kenksmingų organizmų įvežimo į valstybes nares ([4]); kadangi tokios priemonės turi būti praneštos kitoms valstybėms narėms ir Komisijai;

kadangi 1980 m. birželio 24 d. Tarybos direktyvoje 80/665/EEB dėl bulvių žiedinio puvinio kontrolės ([5]) nustatytos būtiniausios priemonės, kurių valstybės narės turi imtis nuo bulvių žiedinio puvinio;

kadangi nuo to laiko supratimas apie bulvių žiedinio puvinio ligą ir bulvių žiedinio puvinio patogeno nustatymas iš esmės pasikeitė;

kadangi Bendrijos augalų sveikatos priežiūros režimo taikymas Bendrijai kaip teritorijai be vidaus sienų lėmė būtinybę dar kartą išnagrinėti ir persvarstyti kai kurias Direktyvos 80/665/EEB nuostatas;

kadangi, atlikus tokį pakartotinį nagrinėjimą, nustatyta, kad Direktyvos 80/665/EEB nuostatos yra nepakankamos ir dėl to reikia tiksliau apibrėžti priemones;

kadangi, esant tokiai padėčiai, Direktyva 80/665/EEB turėtų būti panaikinta ir patvirtintos reikiamos priemonės;

([1]) OL C 93, 1993 4 2, p. 12.
([2]) OL C 176, 1993 6 28, p. 210.
([3]) OL C 161, 1993 6 14, p. 18.
([4]) OL L 26, 1977 1 31, p. 20. Direktyva su paskutiniais pakeitimais, padarytais Komisijos direktyva 92/103/EEB (OL L 363, 1992 12 11, p. 1).
([5]) OL L 180, 1980 7 14, p. 30.

▼B

kadangi tokiose priemonėse turi būti atsižvelgta, pirma, kad liga gali būti latentinė ir nepastebėta augančiuose pasėliuose bei sandėliuojamuose stiebagumbiuose ir todėl efektyviai jai užkirsti kelią galima tik auginant ir vartojant sėklines neužkrėstas bulves, ir, antra, kad norint aptikti ligą reikalingi sistemingi oficialūs tyrimai; kadangi patogeno išplitimas augančiuose pasėliuose nėra svarbiausias veiksnys, tačiau kadangi patogenas gali išlikti per žiemą savaime sudygusiuose bulvių augaluose, tai yra pagrindinis infekcijos šaltinis, plintantis sezonas po sezono; kadangi patogenas daugiausiai plinta bulvėms liečiantis su apkrėstomis bulvėmis bei su sodinimo, kasimo ir apdorojimo įrenginiais arba vežimo bei sandėliavimo talpyklomis, kurie buvo organizmo apkrėsti jų ankstesnio sąlyčio metu su apkrėstomis bulvėmis; kadangi tokie užkrėsti objektai po tokio užkrėtimo gali kurį laiką išlikti užkrečiančiais; kadangi patogeno plitimą galima sumažinti arba sustabdyti tokius objektus dezinfekuojant; kadangi bet koks panašus sėklinių bulvių užkrėtimas kelia didžiulį patogeno išplitimo pavojų;

kadangi, valstybėms narėms nustatant tokių bendrųjų priemonių detales, taip pat ir tvirtinant griežtesnes ar papildomas priemones, skirtas apsisaugoti nuo patogeno įvežimo į jų teritoriją, pageidautina, kad valstybės narės glaudžiai bendradarbiautų su Komisija Augalų sveikatos nuolatiniame komitete (toliau Komitetas),

PRIĖMĖ ŠIĄ DIREKTYVĄ:

1 straipsnis

Šia direktyva numatomos priemonės, kurių turi imtis valstybės narės nuo *Clavibacter michiganensis (Smith) Davis et al. ssp. sepedonicus (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al.,* bulvių žiedinio puvinio sukėlėjo (toliau bakterija) norint:

a) ją aptikti ir nustatyti jos išplitimą;

b) užkirsti kelią jai atsirasti ir išplisti ir

c) aptikus ją, užkirsti kelią jai plisti ir kontroliuoti, stengiantis ją išnaikinti.

2 straipsnis

1. Valstybės narės atlieka sistemingus oficialius tyrimus, ieškant bakterijos stiebagumbiuose ir, kur tikslinga, bulvių augaluose (*Solanum tuberosum* L.), auginamuose jų teritorijoje, norėdamos įsitikinti, ar tokios bakterijos nėra.

Šiems tyrimams, imant stiebagumbių mėginius oficialiam ar oficialiai prižiūrimam laboratoriniam tyrimui, tikrinamos sėklinės ir kitos bulvės, pageidautina iš sandėliuojamų partijų, taikant metodą bakterijai aptikti ir diagnozuoti, apibūdintą I priede. Be to, kur tikslinga, galima atlikti oficialų arba oficialiai prižiūrimą vizualinį kitų mėginių patikrinimą perpjaunant stiebagumbius.

Su augalais šiuos tyrimus reikia atlikti taikant tam tikrus metodus ir mėginiai tiriami atitinkamais oficialiais arba oficialiai prižiūrimais tyrimais.

Mėginių skaičių, kilmę, stratifikaciją ir jų ėmimo laiką nustato atsakingosios oficialios įstaigos, kaip apibrėžta Direktyvoje 77/93/EEB, remdamosi pagrįstais moksliniais ir statistiniais principais bei bakterijos biologija ir atsižvelgdamos į konkrečių valstybių narių bulvių auginimo tradicijas. Todėl tyrimų detalės kasmet pateikiamos kitoms valstybėms narėms ir Komisijai, norint užtikrinti panašų valstybių narių gebėjimo užtikrinti, kad bakterija neaptikta, lygį.

2. Oficialių tyrimų, numatytų 1 dalyje, rezultatai mažiausiai kartą per metus pranešami kitoms valstybėms narėms ir Komisijai. Šio pranešimo detalės yra konfidencialios. Jos gali būti pateikiamos Komitetui Direktyvos 77/93/EEB 16a straipsnyje nustatyta tvarka.

3. Direktyvos 77/93/EEB 16a straipsnyje nustatyta tvarka gali būti priimtos tokios nuostatos:

▼B

— tyrimų, nurodytų anksčiau pateiktoje 1 dalyje, detalės nustatomos remiantis tvirtais moksliniais ir statistiniais principais,

— pranešimo, nurodyto anksčiau pateiktoje 2 dalyje, detalės.

4. Direktyvos 77/93/EEB 16a straipsnyje nustatyta tvarka priimamos tokios nuostatos:

— reikiamas tyrimų ir patikrinimų, nurodytų anksčiau pateiktos 1 dalies trečioje pastraipoje, metodas.

3 straipsnis

Valstybės narės užtikrina, kad apie įtariamą ar patvirtintą bakterijos buvimą bulvių augaluose ir stiebagumbiuose, arba nukastuose, laikomuose ar parduotuose jų teritorijoje stiebagumbiuose būtų pranešama jų pačių atsakingosioms oficialioms įstaigoms.

4 straipsnis

1. Įtariamo buvimo atvejais atsakingosios oficialios valstybės narės, kurioje apie tokius atvejus buvo informuota, įstaigos užtikrina oficialų arba oficialiai prižiūrimą laboratorinį tyrimą, taikant metodą, nustatytą I priede, ir pagal sąlygas, nurodytas II priedo 1 punkte, norint patvirtinti arba paneigti įtariamą buvimą. Pirmuoju atveju taikomi reikalavimai, nustatyti II priedo 2 punkte.

2. Laukiant, kol bus patvirtintas arba paneigtas įtariamas paplitimas pagal 1 dalį, tais atvejais, kai paplitimas įtariamas ir kai:

i) įtariami diagnozuojami vizualiniai ligos simptomai pamatomi arba

ii) gauti teigiami imunofluorescencinio tyrimo, kaip aprašyta I priede, arba kito tinkamo tyrimo rezultatai,

atsakingosios valstybių narių institucijos:

a) uždraudžia visų partijų ar siuntų, iš kurių buvo paimti mėginiai, judėjimą, išskyrus atvejus, kai tai yra jų kontroliuojama ir su sąlyga, kad buvo imtasi priemonių, jog nėra pavojaus bakterijai išplisti;

b) imasi priemonių nustatyti pirminį paplitimo šaltinį;

c) pagal įvertinto pavojaus lygį taiko reikiamas papildomas atsargumo priemones, siekiant užkirsti kelią bakterijai išplisti. Šioms priemonėms gali būti priskiriama oficiali visų kitų stiebagumbių arba augalų, esančių patalpose ar už patalpų ribų, kur buvo įtariama liga, judėjimo kontrolė.

3. Direktyvos 77/93/EEB 16a straipsnyje nustatyta tvarka gali būti patvirtinta:

— priemonės, minimos anksčiau minimos 2 dalies c punkte.

4. Direktyvos 77/93/EEB 16a straipsnyje nustatyta tvarka gali būti patvirtinta:

— kitas tinkamas tyrimas, nurodytas anksčiau minimos 2 dalies ii punkte.

5 straipsnis

1. Jeigu oficialiu ar oficialiai prižiūrimu laboratorijos patikrinimu, taikant metodą, nurodytą I priede, patvirtinamas bakterijos buvimas stiebagumbių, augalų ar augalų dalių mėginiuose, valstybės narės atsakingosios institucijos, atsižvelgdamos į pagrįstus mokslinius principus, bakterijos biologiją ir konkrečias gamybos, prekybos ir perdirbimo sistemas toje valstybėje narėje:

a) laiko užkrėstais stiebagumbius ar augalus, siuntą ir (arba) partiją, įrenginį, transporto priemonę, laivą, sandėlį ar jo dalis ir bet kokius kitus objektus, įskaitant pakuotę, iš kur buvo paimtas mėginys ir, kur tikslinga, auginimo vietą (-as) bei lauką (-us), kur tie stiebagumbiai ar augalai buvo nukasti;

b) atsižvelgdamos į III priedo 1 punkto nuostatas, nustato galimo užkrėtimo mastą per užkrėstos produkcijos sąlytį su gamybos linija iki derliaus nuėmimo arba po jo;

▼B

c) remdamosi nustatytu užkrėtimu pagal a punktą, galimu užkrėtimo masto nustatymu pagal b punktą, ir galimu bakterijos išplitimu, atsižvelgiant į III priedo 2 punkto nuostatas, paženklina teritorijos ribas.

2. Pagal III priedo 3 punkto nuostatas valstybės narės nedelsdamos praneša kitoms valstybėms narėms ir Komisijai apie bet kokį užkrėtimą, nustatytą pagal 1 dalies a punktą ir teritorijos ribų paženklinimo detales pagal 1 dalies c punktą.

Šio pranešimo detalės yra konfidencialios. Jas galima pateikti Komitetui Direktyvos 77/93/EEB 16a straipsnyje nustatyta tvarka.

3. Po šio pranešimo pagal 2 dalį ir minėtas jos sudėtines dalis, kitos valstybės narės, išvardytos pranešime, prireikus nustato užkrėtimą, galimo užkrėtimo mastą ir paženklina teritorijos ribas atitinkamai pagal 1 dalies a, b ir c punktus.

6 straipsnis

Valstybės narės nurodo, kad nustačius, jog stiebagumbiai arba augalai buvo užkrėsti pagal 5 straipsnio 1 dalies a punktą, bulvių, kurios klonavimu susiję su užkrėstomis bulvėmis, atsargos būtų patikrintos pagal 4 straipsnio 1 dalį. Patikrinamas toks stiebagumbių ar augalų kiekis, kokio reikia pirminiam infekcijos šaltiniui ir galimo užkrėtimo mastui nustatyti, pageidautina, pagal rizikos laipsnį.

Po šio patikrinimo, prireikus nustatomas užkrėtimas, galimo užkrėtimo mastas ir paženklinama užkrėsta teritorija atitinkamai pagal 5 straipsnio 1 dalies a, b ir c punktus.

7 straipsnis

1. Valstybės narės nurodo, kad stiebagumbiai ar augalai, nustatyti užkrėstais pagal 5 straipsnio 1 dalies a punktą, negali būti sodinami ir, kad atsakingosioms institucijoms kontroliuojant:

— jie būtų sunaikinami arba

— jie būtų šalinami kitais būdais, naudojantis oficialiai prižiūrima priemone (-ėmis) pagal IV priedo 1 punkto nuostatas, su sąlyga, kad yra užtikrinama, jog nebus didelio pavojaus bakterijai išplisti.

2. Valstybės narės nurodo, kad stiebagumbiai ar augalai, nustatyti galį būti užkrėsti pagal 5 straipsnio 1 dalies b punktą, negali būti sodinami ir, nepažeidžiant patikrinimo, minimo 6 straipsnyje dėl su klonavimu susijusių atsargų, rezultatų, kontroliuojant atsakingosioms oficialioms įstaigoms būtų atitinkamai panaudojami arba šalinami kaip nurodyta IV priedo 2 punkte, tokiu būdu, kad nekiltų rimto pavojus bakterijai išplisti.

3. Valstybės narės nurodo, kad bet koks įrenginys, transporto priemonė, laivas, sandėlis ar jo dalys ir bet kokie kiti objektai, įskaitant pakuotę, nustatyti užkrėstais pagal 5 straipsnio 1 dalies a punktą, arba nustatyti galintys būti užkrėsti pagal 5 straipsnio 1 dalies b punktą, būtų sunaikinami arba valomi ir dezinfekuojami, taikant reikiamus metodus, nurodytus IV priedo 3 punkte. Atlikus dezinfekciją, bet kurie iš šių objektų daugiau nėra laikomi užkrėstais.

4. Nepažeidžiant priemonių, įgyvendintų pagal 1, 2 ir 3 dalis, valstybės narės nurodo, kad teritorijoje, paženklintoje pagal 5 straipsnio 1 dalies c punktą, būtų įgyvendintos priemonės, kaip numatyta IV priedo 4 punkte.

8 straipsnis

1. Valstybės narės nurodo, kad sėklinės bulvės atitiktų Direktyvos 77/93/EEB reikalavimus ir būtų tiesiogiai išvestos iš gautos pagal oficialiai patvirtintą programą medžiagos, kurioje bakterija nebuvo aptikta, atlikus oficialų arba oficialiai prižiūrimą patikrinimą, taikant metodą, nustatytą I priede.

Anksčiau minimas patikrinimas atliekamas:

— tais atvejais, kai užkrėtimas paveikia sėklinių bulvių auginimą, pradinio klonavimo selekcijos augaluose,

▼B

— kitais atvejais, pradinio klonavimo selekcijos augaluose arba tipiniuose elitinių sėklinių bulvių arba ankstesnių dauginimų mėginiuose.

2. Direktyvos 77/93/EEB 16a straipsnyje nustatyta tvarka gali būti patvirtinama:

— išsamios šio straipsnio 1 dalies antrosios pastraipos pirmosios įtraukos taikymo taisyklės,

— taisyklės, skirtos tipiniams mėginiams, numatytiems šio straipsnio 1 dalies antrosios pastraipos antroje įtraukoje.

9 straipsnis

Valstybės narės uždraudžia laikyti ir naudoti bakteriją.

10 straipsnis

Nepažeisdamos Direktyvos 77/93/EEB nuostatų, valstybės narės gali leisti eksperimentiniais ar moksliniais tikslais ir veislių selekcijos darbui nukrypti nuo priemonių, minimų šios Direktyvos 6, 7 ir 9 straipsniuose, jei tokios nukrypti leidžiančios nuostatos nepažeidžia bakterijos kontrolės ir nekyla pavojaus bakterijai išplisti.

11 straipsnis

Valstybės narės gali patvirtinti tokias papildomas arba griežtesnes priemones, kurių gali prireikti kovai su bakterija arba užkirsti kelią jai plisti, jeigu jos atitinka Direktyvos 77/93/EEB nuostatas.

Papildomos priemonės, minimos pirmoje pastraipoje, gali apimti nurodymą sodinti tik tas sėklines bulves, kurios yra oficialiai sertifikuotos arba oficialiai patikrintos tam, kad atitiktų reikalaujamus augalų sveikatos standartus. Pastarieji visų pirma gali būti taikomas tada, kai ūkininkams leidžiama jų pačių ūkiuose sodinti sėklines bulves, kurias jie patys nukasė arba išaugino.

Išsami informacija apie tokias priemones pateikiama kitoms valstybėms narėms ir Komisijai.

12 straipsnis

Šios direktyvos priedų pakeitimai, kurie bus atlikti plėtojantis mokslinėms ir techninėms žinioms, priimami Direktyvos 77/97/EEB 16a straipsnyje nustatyta tvarka.

13 straipsnis

1. Valstybės narės priima ir paskelbia nuostatas, kurios, įsigaliojusios iki 1993 m. lapkričio 15 d., įgyvendina šią direktyvą. Apie tai jos nedelsdamos praneša Komisijai.

Valstybės narės, tvirtindamos šias nuostatas, daro jose nuorodą į šią direktyvą arba tokia nuoroda daroma jas oficialiai skelbiant. Nuorodos darymo tvarką nustato valstybės narės.

Valstybės narės šias nuostatas taiko nuo 1993 m. lapkričio 16 d.

2. Valstybės narės pateikia Komisijai šios direktyvos taikymo srityje priimtų nacionalinės teisės aktų pagrindinių nuostatų tekstus. Apie tai Komisija praneša kitoms valstybėms narėms.

14 straipsnis

Direktyva 80/665/EEB panaikinama nuo 1993 m. lapkričio 16 d.

15 straipsnis

Ši direktyva skirta valstybėms narėms.

▼M1

I PRIEDAS

BAKTERIJOS *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* **(Smith) Davis** *et al.* **ssp.** *SEPEDONICUS* **(Spieckermann et Kotthoff) Davis** *et al.*, **SUKELIANČIOS ŽIEDINĮ PUVINĮ, DIAGNOZAVIMO, NUSTATYMO IR IDENTIFIKAVIMO TYRIMO PLANAS**

TYRIMO PLANO TAIKYMO SRITIS

Pateiktame plane aprašomos įvairios procedūros, taikomos:

i) bulvių stiebagumbių ir augalų žiedinio puvinio diagnozei;

ii) *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* bulvių stiebagumbiuose ir augaluose nustatyti;

iii) *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus (C. m.* subsp. *sepedonicus*) identifikuoti.

PAGRINDINIAI PRINCIPAI

Įvairios tinkamiausios metodikos, patvirtinti reagentai ir duomenys apie pasirengimą testui bei kontrolines medžiagas pateikiami priedėliuose. Laboratorijų, dalyvavusių optimizuojant ir tvirtinant metodikas, sąrašas pateikiamas 1 priedėlyje.

Metodikose numatyta karantine laikomą organizmą ir gyvybingas *C.m.* subsp. *sepedonicus* kultūras naudoti kaip kontrolines medžiagas, todėl tinkamomis karantino sąlygomis ir oficialių augalų karantino įstaigų išduotose licencijose atitinkamomis nurodytomis sąlygomis reikės atlikti procedūras, taikant atitinkamą atliekų pašalinimo metodą.

Testavimo parametrai privalo užtikrinti nuolatinį ir atkartojamą *C. m.* subsp. *sepedonicus* aptikimo lygmenį, esant nustatytoms pasirinktų metodų detekcijos slenkstinėms riboms.

Privaloma tiksliai paruošti teigiamas kontrolines medžiagas.

Atliekant tyrimą atsižvelgus į reikalaujamas metodo jautrumo slenkstines ribas taip pat daroma prielaida, kad reikia pasirinkti teisingus nustatymus, atlikti įrangos kalibravimą ir techninę priežiūrą, rūpestingai tvarkyti ir saugoti reagentus ir imtis visų priemonių, kad būtų išvengta kryžminio bandinių užsikrėtimo, t. y. teigiamus kontrolinius bandinius atskirti nuo tiriamųjų bandinių. Siekiant išvengti administracinių ir kitokių klaidų, ypač susijusių su ženklinimu etiketėmis ir dokumentų tvarkymu, privaloma taikyti kokybės kontrolės standartus.

Įtarus organizmo buvimą, kaip nurodyta Direktyvos 93/85/EEB 4 straipsnio 2 dalyje, daroma prielaida, kad atliekant bandinio diagnostinį arba atrankos testą gaunamas teigiamas rezultatas, kaip nurodyta vaizduojamose diagramose.

Jei pirmojo atrankos testo (IF arba PGR/FISH) rezultatas teigiamas, tai įtariamas užkrėtimas *C. m.* subsp. *sepedonicus* ir privaloma atlikti antrąjį atrankos testą. Jei antrojo atrankos testo rezultatas teigiamas, tai įtarimas (įtariamas organizmo buvimas) patvirtinamas ir būtina toliau atlikti tyrimą pagal nurodytą planą. Jei antrojo atrankos testo rezultatas neigiamas, tada bandinys nėra laikomas užkrėstu *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

Taigi 4 straipsnio 2 dalyje nurodyto IF testo rezultatas yra teigiamas, kaip apibrėžta pagal IF testo parodymus, patvirtintus atlikus atrankos testą (PGR/FISH).

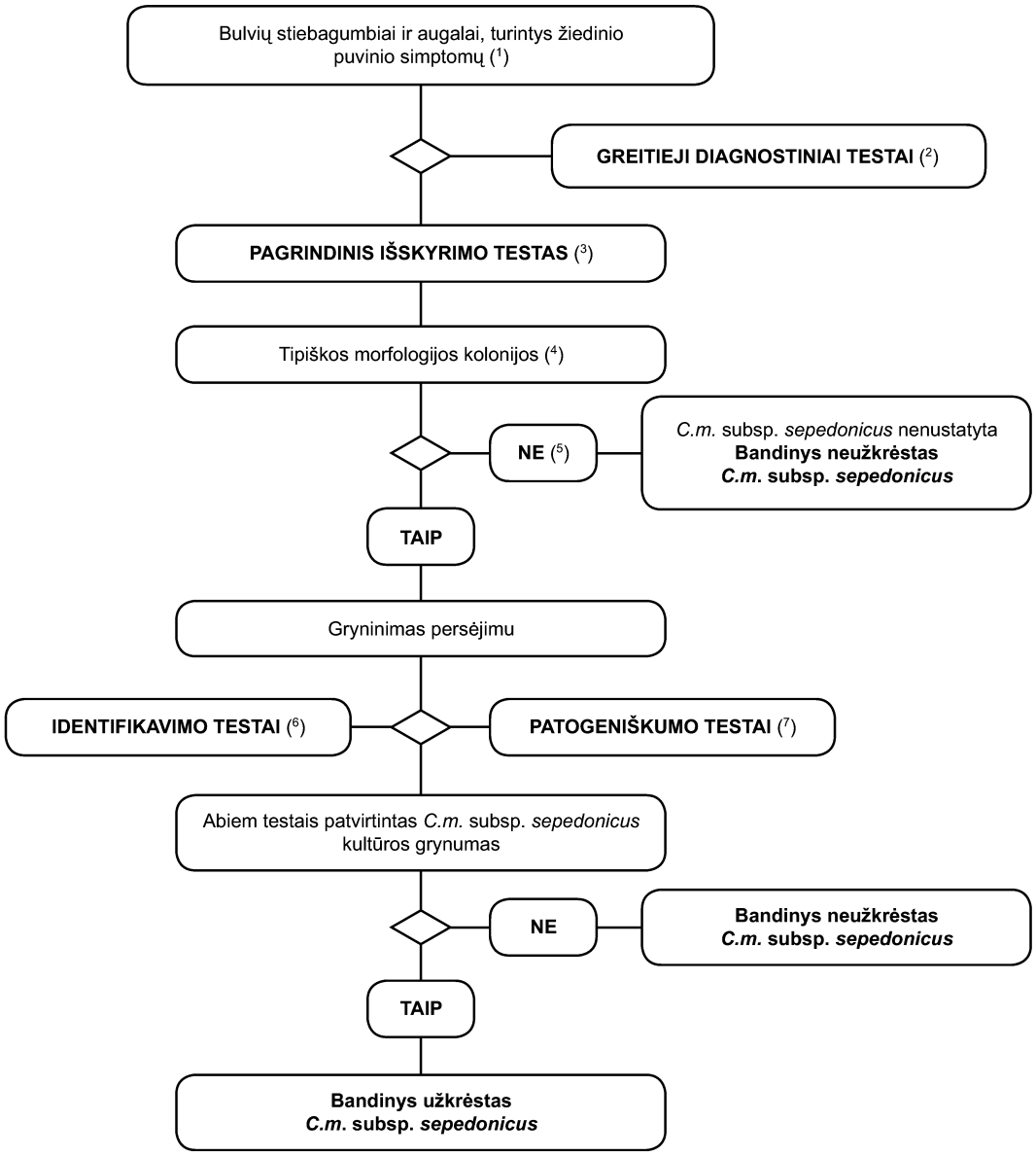
Jei organizmo buvimas patvirtinamas, tai padaroma prielaida, kaip nurodyta Direktyvos 93/85/EEB 5 straipsnio 1 dalyje, kad buvo išskirta ir identifikuota patogeninė grynoji *C. m.* subsp. *sepedonicus* kultūra.

1. VAIZDUOJAMOSIOS DIAGRAMOS PRISTATYMAS

1.1. **Žiedinio puvinio diagnozavimo bulvių stiebagumbiuose ir augaluose planas**

Ši tyrimo tvarka taikoma tiriant bulvių stiebagumbius ir augalus, turinčius arba įtariamus turint tipinių žiedinio puvinio simptomų. Ją taikant atliekamas greitosios atrankos testas, patogeno išskyrimas iš užkrėsto vaskuliarinio audinio ir pasėjimas į kultūrinę terpę ir, gavus teigiamą rezultatą, *C. m.* subsp. *sepedonicus* kultūros identifikavimas.

▼**M1**



(1) Simptomų aprašymas pateikiamas 2 skirsnyje.

(2) Atitinkami testai:
— IF testas (4 skirsnis),
— PGR testas (6 skirsnis),
— FISH testas (5 skirsnis).

(3) Nors patogeno išskyrimas iš tipiškų simptomų turinčios augalinės medžiagos praskiedimo būdu atliekamas tiesiogiai, paskesnėse užkrėtimo stadijose kultūros gali neaugti. Saprofitinės bakterijos, augančios ant sergančios medžiagos, gali peraugti arba slopinti patogeno augimą kultūroms auginti skirtoje terpėje. Todėl rekomenduojama naudoti abi: ne selektyvią ir selektyvią terpes, pirmiausia MTNA (8 skirsnis) arba biotestą (7 skirsnis).

(4) Kolonijos tipiškos morfologijos aprašymas pateikiamas 8 skirsnyje.

(5) Jei išskyrimo testo rezultatas neigiamas, o ligos simptomai tipiški, tokiu atveju privaloma pakartoti išskyrimą.

(6) *C.m.* subsp. *sepedonicus* kultūros grynumas patikimai identifikuojamas tik atliekant 9 skirsnyje išvardytus testus.

(7) Patogeniškumo testas aprašytas 10 skirsnyje.

▼**M1**

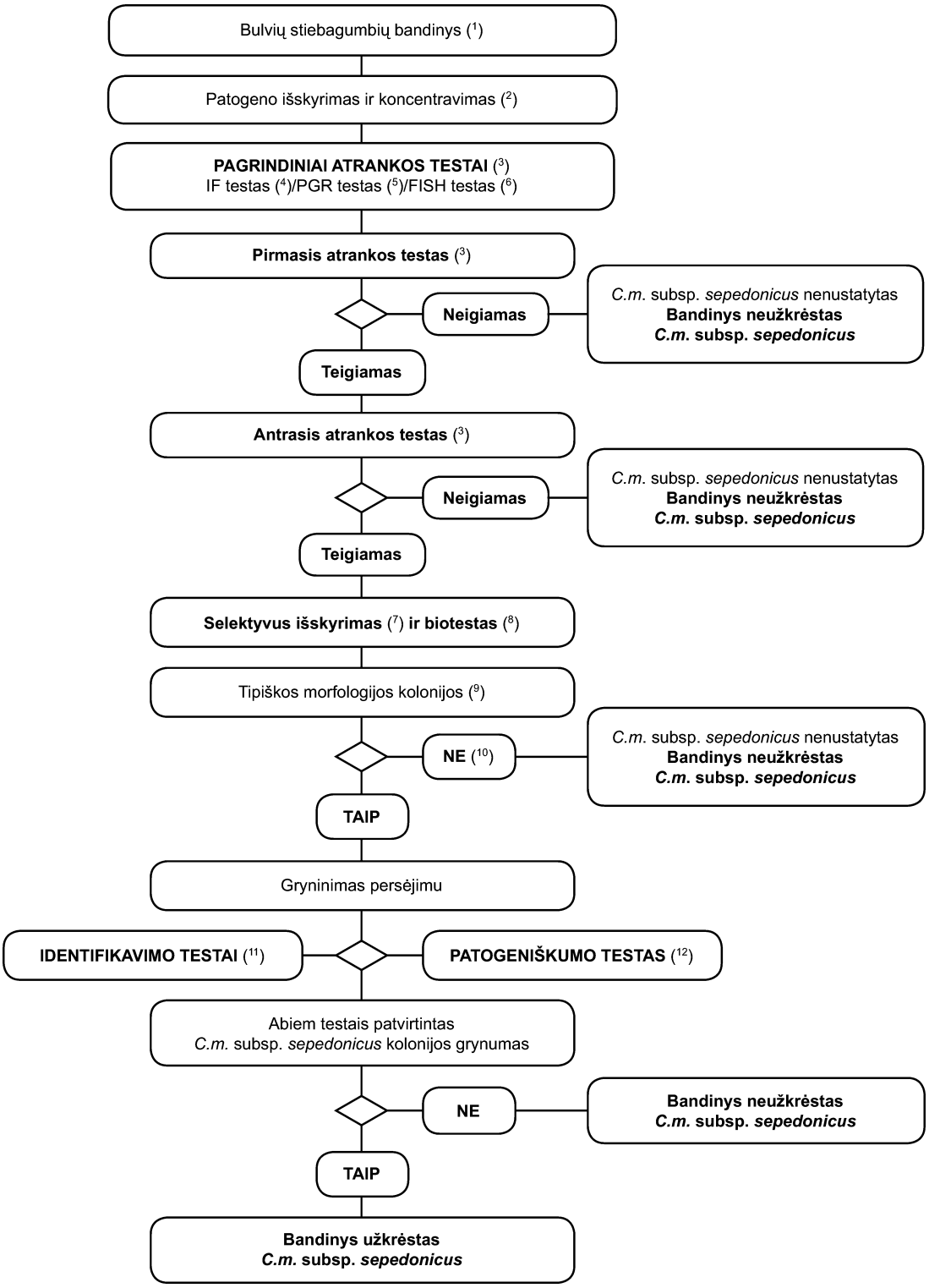
1.2. *Clavibacter michiganensis* **ssp.** *sepedonicus* **nustatymo ir identifikavimo besimptomiuose bulvių stiebagumbių bandiniuose planas**

Principas

Testavimo tvarka skirta bulvių stiebagumbių latentinėms infekcijoms nustatyti. Išskiriant patogeną, ypač tipiškų kolonijų atveju, o vėliau tvirtinant jo kolonijų grynumą, kaip *C. m.* subsp. *sepedonicus* atveju, privaloma papildomai atlikti du atrankos testus, pagrįstus skirtingais biologijos principais, ir gauti teigiamą rezultatą. Tik vieno atrankos testo teigiamo rezultato nepakanka, kad būtų galima įtarti bandinį.

Atrankos ir išskyrimo testų slenkstinė nustatymo jautrumo riba turėtų siekti 10^3–10^4 ląstelių/ml pakartotinai suspenduotose nuosėdose, naudojamose kaip teigiami kontroliniai bandiniai atliekant kiekvieną testų seriją.

▼M1


Bulvių stiebagumbių bandinys (1)
Patogeno išskyrimas ir koncentravimas (2)
PAGRINDINIAI ATRANKOS TESTAI (3)
IF testas (4)/PGR testas (5)/FISH testas (6)
Pirmasis atrankos testas (3)
Neigiamas
C.m. subsp. sepedonicus nenustatytas
Bandinys neužkrėstas
C.m. subsp. sepedonicus
Teigiamas
Antrasis atrankos testas (3)
Neigiamas
C.m. subsp. sepedonicus nenustatytas
Bandinys neužkrėstas
C.m. subsp. sepedonicus
Teigiamas
Selektyvus išskyrimas (7) ir biotestas (8)
Tipiškos morfologijos kolonijos (9)
NE (10)
C.m. subsp. sepedonicus nenustatytas
Bandinys neužkrėstas
C.m. subsp. sepedonicus
TAIP
Gryninimas persėjimu
IDENTIFIKAVIMO TESTAI (11)
PATOGENIŠKUMO TESTAS (12)
Abiem testais patvirtintas
C.m. subsp. sepedonicus kolonijos grynumas
NE
Bandinys neužkrėstas
C.m. subsp. sepedonicus
TAIP
Bandinys užkrėstas
C.m. subsp. sepedonicus

▼M1

(1) Standartinį bandinį sudaro 200 stiebagumbių, tačiau šią tvarką galima taikyti mažesniems nei 200 stiebagumbių bandiniams, turint mažiau stiebagumbių.

(2) Patogeno išskyrimo ir koncentravimo metodai aprašyti 3.1 skirsnyje.

(3) Jei bent dviejų testų, besiskiriančių pagal biologinius atlikimo principus, rezultatai teigiami, būtina atlikti išskyrimą ir patvirtinimą. Atliekamas bent vienas atrankos testas. Jei šio testo rezultatas neigiamas, bandinys laikomas neigiamu. Jei šio testo rezultatas teigiamas, reikalaujama atlikti du ar daugiau atrankos testų, besiskiriančių pagal biologinius principus, pirmajam teigiamam rezultatui patvirtinti. Jei antrojo testo arba kitų testų rezultatai neigiami, bandinys laikomas neigiamu. Paskesnių testų nereikalaujama atlikti.

(4) Imunofluorescencijos (IF) testas.
Atliekant imunofluorescencijos testą, visada naudojami polikloniniai antikūnai, o papildomi monokloniniai antikūnai gali suteikti papildomo specifiškumo (žr. 4 skirsnį).

(5) PGR testas.
Naudoti atitinkamai patvirtintus PGR reagentus ir metodikas (žr. 6 skirsnį).

(6) Fish testas.
Naudoti atitinkamai patvirtintus reagentus ir metodikas (žr. 5 skirsnį).

(7) Selektyvus išskyrimas.
Auginimas MTNA arba NCP-88 terpėje ir pakartotinai suspenduotų nuosėdų praskiedimas santykiu 1:100 dauguma atvejų yra tinkamas *C. m.* subsp. *sepedonicus* tiesioginio išskyrimo metodas. Tipiškos kolonijos gaunamos praėjus 3–10 dienų nuo pasėjimo į lėkšteles. Po to patogeną galima išgryninti ir identifikuoti. Atliekant testą, kad būtų panaudotos visos jo teikiamos galimybės, išpjautus stiebagumbio viršūnės šerdies gabaliukus reikia kruopščiai paruošti, kad būtų išvengta antrinių bakterijų, užkrečiančių stiebagumbius, kurios augimo terpėje yra *C. m.* subsp. *sepedonicus* antagonistai, infekcijos, nes jos gali peraugti patogeną. Jei auginimo lėkštelėse testas nepavyksta, patogeną reikia išskirti iš biotestui naudojamų augalų (žr. 8 skirsnį).

(8) Biotestas taikomas *C. m.* subsp. *sepedonicus* išskirti iš bulvių ekstrakto nuosėdų selektyvaus praturtinimo baklažanuose (*Solanum melongena*) būdu. Atliekant testą, privaloma laikytis optimalių inkubavimo sąlygų, kaip nurodyta šio metodo aprašyme. *C. m.* subsp. *sepedonicus* augimą MTNA ar NCP-88 terpėje slopinančios bakterijos netrukdys atlikti šio testo (žr. 7 skirsnį).

(9) Tipiška kolonijų morfologija apibūdinta 8 skirsnyje.

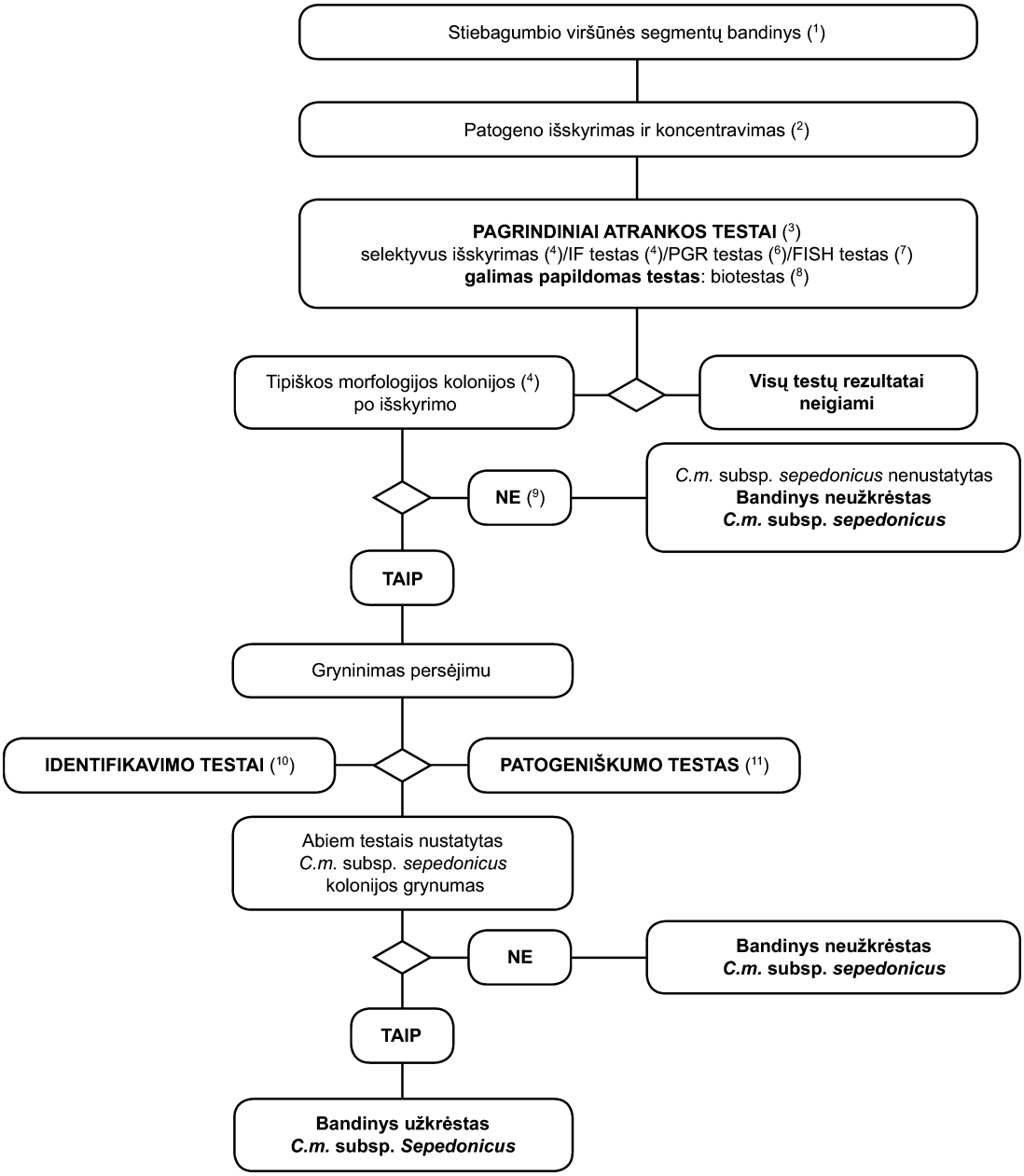
(10) Auginimo terpėje arba biotesto rezultatai gali būti neigiami dėl saprofitinių bakterijų konkurencijos arba vykdomo slopinimo. Jei atrankos testų rezultatai teigiami, o išskyrimo testų rezultatai neigiami, reikia pakartoti išskyrimo iš tų pačių nuosėdų testus arba naudojant papildomą vaskuliarinį audinį, paimtą šalia to paties bandinio stiebagumbių viršūnės gabaliukų išpjovimo vietos, jei būtina ištirti papildomus bandinius.

(11) Siekiant patikimai identifikuoti galimas grynas *C. m.* subsp. *sepedonicus* kolonijas, reikia atlikti 9 skirsnyje aprašytus testus.

(12) Patogeniškumo testas aprašytas 10 skirsnyje.

▼M1

1.3. *Clavibacter michiganensis* **ssp.** *sepedonicus* **nustatymo ir identifikavimo besimptomiuose bulvių augaluose planas**



▼**M1**

(1) Žr. 3.2 skirsnį dėl rekomenduojamų bandinio dydžių.

(2) Patogeno išskyrimo ir koncentravimo metodai aprašyti 3.2 skirsnyje.

(3) Jei bent dviejų pagal biologinius principus besiskiriančių testų rezultatai teigiami, reikia atlikti išskyrimą ir patvirtinimą.
Atliekamas mažiausiai vienas atrankos testas. Jei šio testo rezultatas neigiamas, bandinys laikomas neigiamu. Tuo atveju, kai šio testo rezultatas teigiamas, reikalaujama atlikti antrą testą arba daugiau pagal biologinius principus besiskiriančių testų pirmajam teigiamam rezultatui patvirtinti. Jei antrojo testo arba kitų testų rezultatai neigiami, bandinys laikomas neigiamu. Paskesnių testų atlikti nereikia.

(4) Selektyvaus išskyrimo testas ir tipiška kolonijų morfologija aprašyti 8 skirsnyje.

(5) IF testas aprašytas 4 skirsnyje.

(6) PGR testai aprašyti 6 skirsnyje.

(7) FISH testas aprašytas 5 skirsnyje.

(8) Biotestas aprašytas 7 skirsnyje.

(9) Auginimo terpėje arba biotesto rezultatai gali būti neigiami dėl saprofitinių bakterijų keliamos konkurencijos arba slopinimo. Kai atrankos testų rezultatai yra teigiami, tačiau išskyrimo testų rezultatai neigiami, išskyrimo testai pakartojami, jei būtina, tiriant papildomus bandinius.

(10) Siekiant patikimai identifikuoti galimas grynas *C. m.* subsp. *sepedonicus* kolonijas, reikia atlikti 9 skirsnyje aprašytus testus.

(11) Patogeniškumo testas aprašytas 10 skirsnyje.

▼M1

2. VIZUALINIS ŽIEDINIO PUVINIO SIMPTOMŲ TYRIMAS

2.1. **Bulvių augalai**

Europos klimato sąlygomis simptomai labai retai stebimi lauke ir dažnai tik vegetacijos laikotarpio pabaigoje. Be to, šie simptomai dažnai yra paslėpti ir (arba) painiojami su kitomis ligomis, senėjimu ar mechaniniais augalų pažeidimais. Taigi, atliekant patikrinimus lauko sąlygomis, labai lengva simptomų nepastebėti. Vytimo simptomai labai skiriasi nuo rudojo puvinio simptomų; paprastai vytimas vyksta labai lėtai ir iš pradžių stebimas tik lapų pakraščiuose. Jauni užkrėsti lapai toliau auga, išskyrus užkrėstas lapo dalis, kurios auga lėčiau. Dėl to susiformuoja keistų formų lapai. Lapų, patyrusių pažeidimą dėl kotelio gilesnių vaskuliarinių audinių vystymosi blokavimo, žalia spalva dažnai išblunka ir juose susidaro geltonos ir oranžinės spalvos zonos tarp lapo gyslų. Pažeisti lapai, sudėtinių lapų lapeliai ir netgi koteliai gali visiškai sunykti. Dažnai lapų ir stiebagumbių dydis sumažėja. Išimtiniais atvejais augai būna žemaūgiai. Simptomų spektro spalvotus atvaizdus galima rasti tinklavietėje http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

2.2. **Bulvių stiebagumbiai**

Pirminiai simptomai yra tam tikras audinio skaidrumas arba peršviečiamumas, neminkštėjimas aplink vaskuliarinę sistemą, ypač prie viršūnės. Vaskuliarinis žiedas prie viršūnės gali būti šiek tiek tamsesnės spalvos negu paprastai. Pirmasis lengvai nustatomas simptomas – vaskuliarinis žiedas yra gelsvas, o švelniai paspaudus gumbą iš indų pradeda sunktis į sūrio konsistenciją panaši medžiaga. Šioje besisunkiančioje medžiagoje yra milijonai bakterijų. Šioje stadijoje vaskuliarinis audinys gali paruduoti ir stiebagumbio simptomai yra panašūs į *Ralstonia solanacearum* sukeliamo rudojo puvinio simptomus. Iš pradžių šie simptomai gali būti matomi tik vienoje žiedo dalyje, nebūtinai prie viršūnės, ir palaipsniui gali išplisti visame žiede. Užkratui plintant, vaskuliarinis audinys žūva; išorinė žievės dalis gali atsiskirti nuo vidinės žievės. Vėlesnėse užkrėtimo stadijose stiebagumbio paviršiuje atsiranda įtrūkimų, kurių pakraščiai dažnai būna raudonai rudi. Neseniai Europoje buvo užregistruota keletas atvejų, kai žievės centro puvinys, susidarantis tuo pačiu metu, kaip ir vaskuliarinis žiedas, sąlygojo tuščiaviduriškumo ir nekrozės atsiradimą. Antrinis užkrėtimas bakterijomis arba grybais gali užmaskuoti simptomus ir gali būti sunku, netgi neįmanoma, vėlyvuosius žiedinio puvinio simptomus atskirti nuo kitų stiebagumbių puvinių. Gali pasitaikyti ir netipiškų simptomų. Simptomų spektro spalvotus atvaizdus galima rasti tinklavietėje http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

3. BANDINIO PARUOŠIMAS

3.1. **Bulvių stiebagumbiai**

Pastaba:

— Standartinis vienam testui skirto bandinio dydis -200 stiebagumbių. Intensyvesnės imties atveju reikia atlikti daugiau šio dydžio bandinio testų. Dėl didesnio stiebagumbių skaičiaus viename bandinyje neįmanoma arba sunku aiškinti rezultatus. Tačiau šią tvarką galima taikyti mažesniems nei 200 stiebagumbių bandiniams, turint mažiau stiebagumbių.

— Visų toliau aprašytų aptikimo metodų patvirtinimas pagrįstas 200 stiebagumbių bandinių tyrimu.

— Toliau aprašytą bulvių ekstraktą taip *pat galima naudoti aptinkant bulvių rudojo puvinio sukėlėją - bakteriją Ralstonia solanacearum.*

Galima atlikti išankstinį apdorojimą prieš bandinio paruošimą:

Nuplauti stiebagumbius. Naudoti atitinkamus dezinfektantus (chloro junginius, kai PGR naudojama visiškai pašalinti patogeno DNR) ir detergentus, skirtus kiekvienam bandiniui. Stiebagumbiai išdžiovinami oru. Ši plovimo tvarka ypač naudinga (bet jos taikyti nereikalaujama), kai naudojami bandiniai, turintys dirvožemio perteklių ir kai būtina atlikti PGR testą arba taikyti kitą tiesioginį DNR išskyrimo metodą.

3.1.1. Kiekvieno stiebagumbio viršūnės oda pašalinama švariu ir dezinfekuotu skalpeliu arba daržovėms pjaustyti skirtu peiliu taip, kad vaskuliarinis audinys taptų matomas. Kruopščiai išpjaunamas stiebagumbio

▼M1

viršūnės vaskuliarinio audinio gabaliukas taip, kad nevaskuliarinio audinio būtų kuo mažiau (žr. tinklavietę http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

Pastaba:

Atskirti bet kurį stiebagumbį su įtariamais žiedinio puvinio simptomais ir ištirti atskirai.

Jei šalinant stiebagumbio viršūnę pastebimi įtariami žiedinio puvinio simptomai, nupjovus stiebagumbio dalį prie viršūnės reikia vizualiai apžiūrėti stiebagumbį. Bet kurį perpjautą stiebagumbį reikia laikyti dvi dienas kambario temperatūroje, kad šis sukamštėtų, o vėliau laikyti karantino sąlygomis (4–10 °C temperatūroje), kol bus atlikti visi testai. Visus vienam bandiniui priklausančius stiebagumbius (įskaitant stiebagumbius su įtariamais simptomais) reikėtų laikyti taip, kaip nurodyta II priede.

3.1.2. Stiebagumbių viršūnių gabaliukai surenkami į nepanaudotas vienkartines talpyklas, kurias galima uždaryti ir (arba) užplombuoti (tuo atveju, kai jos naudojamos pakartotinai, jau panaudotas talpyklas reikėtų kruopščiai išvalyti ir dezinfekuoti chloro junginiais). Pirmiausia stiebagumbių viršūnių gabaliukus reikėtų nedelsiant apdoroti. Jei tai padaryti neįmanoma, jie saugomi talpykloje, nepridedant buferio, šaltai ne ilgiau kaip 72 valandas arba kambario temperatūroje ne ilgiau kaip 24 valandas. Gabaliukų džiūvimas, kamštėjimas ir saprofitinių bakterijų augimas gali kliudyti aptikti žiedinį puvinį sukeliančią bakteriją.

3.1.3. Stiebagumbio viršūnės gabaliukai apdorojami taikant vieną iš šių procedūrų:

a) Gabaliukai pamerkiami į pakankamą (apie 40 ml) ekstrahavimo buferinio tirpalo tūrį (3 priedėlis) ir 4 valandas žemesnėje nei 24 ° C temperatūroje kratomi rotorine kratykle (50–100 rpm), arba 16–24 valandas šaldomi.

b) Gabaliukai pakankamame (apie 40 ml) ekstrahavimo buferinio tirpalo tūryje (3 priedėlis) homogenizuojami naudojant maišyklę (pvz., *Waring* arba *Ultra Thurax*) arba juos sutraiškant užplombuotame vienkartiniame mirkymo maišelyje (pvz., *Stomacher* ar *Bioreba* tvirto polietileno maišelyje, 150 mm × 250 mm; sterilizuotame apšvita) guma dengtu mediniu plaktuku arba atitinkamu malimo prietaisu (pvz., *Homex*).

Pastaba:

Bandinių kryžminio užsikrėtimo rizika yra ypač didelė, kai bandiniai homogenizuojami naudojant maišyklę. Atsargumo priemonių imamasi stengiantis išvengti aerozolio susidarymo arba nuotėkio išskyrimo metu. Užtikrinama, kad kiekvienam bandiniui būtų naudojami atskiri ką tik sterilizuoti maišyklės peiliai ir indai. Jei atliekamas PGR testas, stengiamasi išvengti DNR pernešimo į talpyklas ar malimo aparatą. Atliekant PGR testą malimą rekomenduojama atlikti vienkartiniuose maišeliuose ir vienkartiniuose vamzdeliuose.

3.1.4. Viršnuosėdinis skystis nupilamas. Jei jis pernelyg drumstas, yra skaidrinamas lėtai centrifuguojant (ne didesniu kaip 180 g greičiu 10 minučių 4–10 °C temperatūroje) arba filtravimu vakuume (40–100 µm), perplaunant filtrą papildomu (10 ml) ekstrahavimo buferiniu tirpalu (3 priedėlis).

3.1.5. Bakterijos frakcija koncentruojama centrifuguojant 7 000 g greičiu 15 minučių (arba 10 000 g greičiu 10 minučių) 4–10 °C temperatūroje ir viršnuosėdinis skystis nupilamas nepažeidžiant nuosėdų.

3.1.6. Nuosėdos pakartotinai suspenduojamos 1,5 ml nuosėdų buferiniame tirpale (3 priedėlis). Naudojama 500 µl tirpalo *C. m.* subsp. *Sepedonicus* tyrimams, 500 µl tirpalo *Ralstonia solanacearum* tyrimams ir 500 µl tirpalo lyginamiesiems tyrimams. Pripilama sterilaus glicerino į 500 µl lyginamąją ir likutinę bandinio dalis, kad galutinė koncentracija siektų 10–25 % (tūris/tūris), sumaišoma ir saugoma –16–24 °C temperatūroje (savaites) arba –68–86 °C temperatūroje (mėnesius). Tyrimo metu tiriamosios alikvotinės bandinio dalys saugomos 4–10 °C temperatūroje.

Kartotinis sušaldymas ir tirpdymas nerekomenduotini.

Jei ekstraktą reikia vežti, jis pristatomas šaldomoje dėžėje per 24-48 valandas.

▼M1

3.1.7. Siekiant išvengti užsikrėtimo, būtina, kad visi *C. m.* subsp. *sepedonicus* teigiami kontroliniai bandiniai ir tiriamieji bandiniai būtų apdorojami atskirai. Šitaip daroma tiriant visas IF plokšteles ir atliekant visus testus.

3.2. **Bulvių augalai**

Pastaba:

Kad būtų aptiktos latentinės *C. m.* subsp. *sepedonicus* populiacijos, rekomenduojama tirti sudėtinius bandinius. Ši tvarka gali būti sėkmingai taikoma tiriant 200 stiebo dalių sudėtinius bandinius. Atliekant apžiūras, rekomenduojama naudoti statistiškai patikimą tiriamosios augalo populiacijos bandinį.

3.2.1. Nuo kiekvieno stiebo pagrindo virš pat dirvos sluoksnio atpjaunamas 1–2 cm segmentas švariu dezinfekuotu peiliu arba genėjimui skirtu sekatoriumi.

Stiebo segmentai trumpai dezinfekuojami 70 % etanoliu ir nedelsiant išdžiovinami sugeriamuoju popieriumi.

Stiebo segmentai surenkami į uždarą sterilią talpyklą šia bandinių imties tvarka:

3.2.2. Stiebo segmentai apdorojami taikant vieną iš šių procedūrų:

a) Segmentai pamerkiami į pakankamo tūrio (apytiksliai 40 ml) ekstrahavimo buferinį tirpalą (3 priedėlis) ir 4 valandas maišomi besisukančia kratykle (50–100 rpm greičiu) mažesnėje nei 24 °C temperatūroje arba šaldomi 16–24 valandas.

b) Apdorojami nedelsiant, sumalant segmentus tvirtame mirkymo maišelyje (pvz., *Stomacher* arba *Bioreba*), įpylus atitinkamą ekstrakcijos buferinio tirpalo kiekį (3 priedėlis) guma dengtu plaktuku arba atitinkamu malimo aparatu (pvz., *Homex*). Jei šito padaryti neįmanoma, kamieno segmentai saugomi šaltai ne ilgiau kaip 72 valandas arba kambario temperatūroje ne ilgiau kaip 24 valandas.

3.2.3. Leidus susidaryti nuosėdoms per 15 minučių, viršnuosėdinis skystis nupilamas.

3.2.4. Paprastai vėliau nereikalaujama skaidrinti ekstrakto arba koncentruoti bakterinės frakcijos, tačiau tai galima atlikti filtruojant ir (arba) centrifuguojant, kaip aprašyta 3.1.4–3.1.6 skirsniuose.

3.2.5. Neskiestas arba koncentruotas bandinio ekstraktas padalijamas į dvi lygias dalis. Viena ekstrakto dalis tiriama 4–10 °C temperatūroje, o kita saugoma 10–25 % (tūris/tūris) steriliame glicerine –16–24 °C temperatūroje (savaites) arba –68–86 °C temperatūroje (mėnesius) iki paskesnio tyrimo pradžios.

4. IMUNOFLUORESCENCINĖS ANALIZĖS (IF) TESTAS

Principas

Imunofluorescencinės analizės testas kaip svarbiausias atrankos testas, rekomenduojamas taikyti dėl jo tinkamumo pasiekti reikalaujamas slenkstines vertes.

Kai IF testas atliekamas kaip pagrindinis atrankos testas ir IF rezultatai teigiami, PGR ir FISH testą reikia atlikti kaip antrąjį atrankos testą. Kai IF testas atliekamas kaip antrasis atrankos testas ir IF rezultatai teigiami, reikia atlikti paskesnį testavimą pagal vaizduojamąją diagramą, kad būtų baigta analizė.

Pastaba:

Visada naudoti polikloninius antikūnus, kai IF testas atliekamas kaip pagrindinis atrankos testas. Jei naudojant polikloninius antikūnus IF testo rezultatai teigiami, paskesnė atranka naudojant monokloninius antikūnus suteiktų daugiau specifiškumo, tačiau gali būti ne tokia jautri.

Naudojami antikūnai, būdingi etaloniniam *C. m.* subsp. *sepedonicus* štamui. Rekomenduojama nustatyti kiekvienos naujos antikūnų partijos titrą. Titras apibrėžiamas kaip didžiausias praskiedimas, kuriam esant vyksta reakcija, tiriant homologinio *C. m.* subsp. *sepedonicus* štamo 10^5-10^6 ląstelių/ml ląstelių suspensiją ir naudojant atitinkamą gamintojo rekomenduojamą fluoresceino izotiocianato (FITC) konjugatą. Neišgrynintų polikloninių arba monokloninių antikūnų titras turėtų būti ne mažesnis kaip 1:2000. Tyrimo metu antikūnus reikėtų praskiesti iki darbinio praskiedimo (DP), artimo jų titrui arba lygaus jam. Naudoti patvirtintus antikūnus (žr. tinklavietę http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

▼**M1**

Reikėtų tirti tik šviežiai pagamintus ekstraktus. Jei būtina, galima tirti ekstraktus, laikomus glicerine –68 –86 °C temperatūroje. Gliceriną iš bandinio galima pašalinti pridėjus 1 ml nuosėdų buferinio tirpalo (4 priedėlis), pakartotinai centrifuguoti 15 minučių 7 000 g greičiu ir pakartotinai suspenduoti, pripylus nuosėdų buferinio tirpalo lygų tūrį. Dažnai šitai atlikti nebūtina, ypač jei bandiniai fiksuojami ant plokštelės liepsna (žr. 2.2 skirsnį).

Paruošti atskiras teigiamas kontrolines plokšteles, į kurių langelius bus pripilta homologinio arba kurio nors etaloninio *C. m.* subsp. *sepedonicus* štamo, suspenduoto bulvių ekstrakte, kaip nurodyta 2 priedėlyje, ir pasirinktinai buferiniame tirpale.

Jei įmanoma, į tos pačios plokštelės langelius turėtų būti pripilama natūraliai užkrėsto audinio preparato (palaikomo liofilizacijos arba šaldymo –16–24 °C temperatūroje būdu) kaip panašaus kontrolinio bandinio.

Bandinių, kurie po ankstesnių tyrimų buvo laikomi neigiamais, ekstraktų dalys turėtų būti naudojamos kaip neigiami kontroliniai bandiniai.

Naudoti daug langelių turinčias mikroskopines plokšteles, pageidautina su 10 langelių, mažiausiai 6 mm skersmens.

Kontrolinis bandinys tiriamas taip pat, kaip ir tiriamasis bandinys.

4.1. Tyrimui skirtos plokštelės paruošiamos taikant vieną iš šių procedūrų:

i) Nuosėdos, turinčios santykinai nedaug krakmolo:

Standartinis tūris (15 µl tinka dirbti, kai naudojamos plokštelės, kurių langelio skersmuo yra 6 mm, o esant didesniems langeliams, padidinamas tūris) 1:100 praskiestų pakartotinai suspenduotų bulvių nuosėdų lašinamas į pirmąjį langelį. Vėliau nepraskiestų (1/1) pakartotinai suspenduotų nuosėdų panašus tūris lašinamas į vienos tos pačios eilės langelius. Antrojoje eilutėje pakartojamas pirmasis bandinys arba lašinamas antrasis bandinys, kaip parodyta 1 pav.

ii) Kitų nuosėdų atveju:

Pakartotinai suspenduotos nuosėdos praskiedžiamos nuosėdų buferiniame tirpale santykiu 1:10 ir 1:100. Standartinis pakartotinai suspenduotų ir kiekvieno praskiedimo nuosėdų tūris (15 µl tinka dirbti, kai naudojamos plokštelės, kurių langelio skersmuo yra 6 mm, o esant didesniems langeliams, padidinamas tūris) lašinamas į langelius vienoje langelių eilutėje.. Antrojoje eilutėje pakartojamas pirmasis bandinys arba lašinamas antrasis bandinys, kaip parodyta 2 pav.

4.2. Lašeliai išdžiovinami kambario temperatūroje arba kaitinami 40–45 ° C temperatūroje. Bakterinės ląstelės fiksuojamos prie plokštelės kaitinant (15 minučių 60 °C temperatūroje) arba liepsna, 95 % etanoliu arba bet kuria kita antikūnų tiekėjų nurodyta tvarka.

Jei būtina, fiksuotos plokštelės vėliau gali būti saugomos šaltai sausoje dėžėje kiek galima trumpiau (ilgiausiai 3 mėnesius) iki tyrimo.

4.3. IF tvarka

i) Plokštelė, paruošta kaip nurodyta 4.1(i):

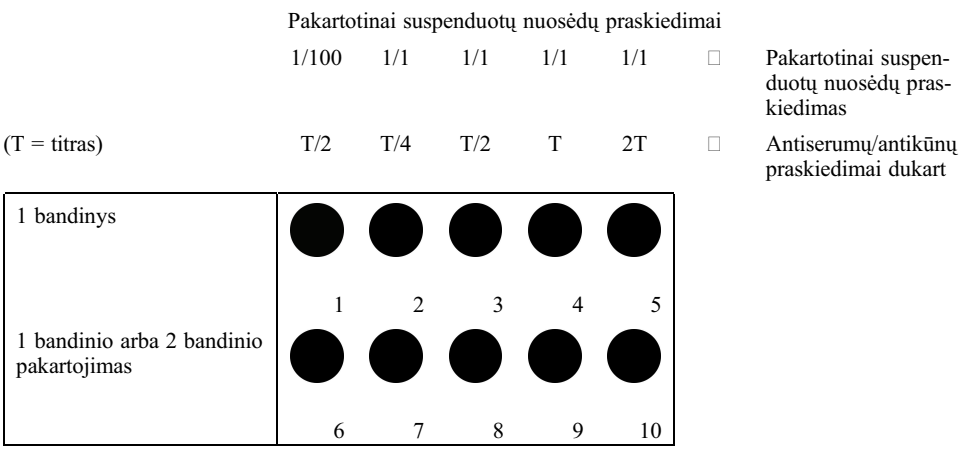
Paruošiamas antikūnų dukart praskiestų IF buferiniu tirpalu, rinkinys. Į pirmą langelį pripilama 1/2 titro (T/2), į kitus - 1/4 titro (T/4), 1/2 titro, (T/2), titrą (T) ir dukart titro antikūnų (2T).

ii) Plokštelė, paruošta kaip nurodyta 4.1(ii):

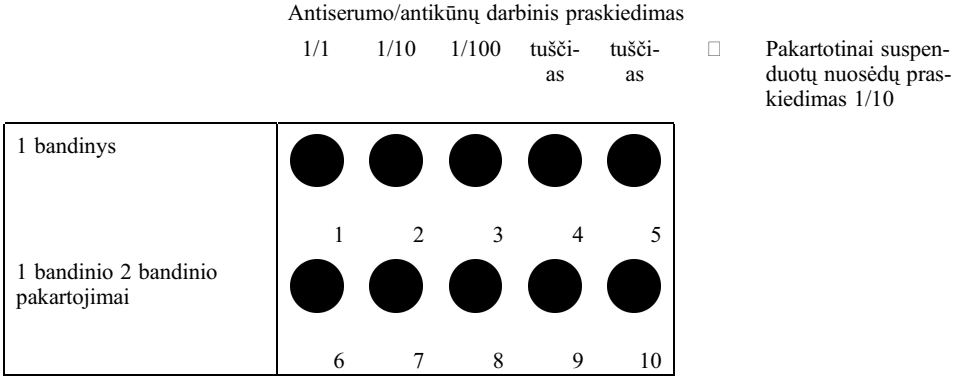
Atliekamas antikūnų darbinis praskiedimas (DP) IF buferiniame tirpale. Darbinis praskiedimas turi įtakos antikūnų specifiškumui.

▼**M1**

1 pav. Tiriamosios plokštelės paruošimas pagal 4.1(i) ir 4.3(i)



2 pav. Tiriamosios plokštelės paruošimas pagal 4.1(ii) ir 4.3(ii)



4.3.1. Plokštelės išdėliojamos ant drėgno popieriaus. Kiekvienas testuojamasis langelis sklidinai pripildomas praskiestų antikūnų tirpalo. Į kiekvieną langelį pripilamo antikūnų tirpalo tūris turi atitikti bent tiriamojo ekstrakto tūrį.

Antikūnų tiekėjams nepateikus naudojimo instrukcijų, laikomasi šios tvarkos:

4.3.2. Plokštelės laikomos uždengtos ant drėgno popieriaus 30 minučių kambario temperatūroje (18–25 °C).

4.3.3. Nukrėsti nuo kiekvienos plokštelės lašelius ir kruopščiai nuplauti IF buferiniu tirpalu. Perplaunama pripilant IF buferinio tirpalo, turinčio *Tween* (3 priedėlis), ir laikoma 5 minutes, po to pripilama IF buferinio tirpalo ir laikoma dar 5 minutes. Vengti aerozolio susidarymo arba lašelių pernešimo, dėl kurio gali įvykti kryžminė tarša. Perteklinis vanduo atsargiai pašalinamas nusausinant.

4.3.4. Plokštelės išdėliojamos ant drėgno popieriaus, į langelius pripilama praskiesto titrui nustatyti naudojamo FITC konjugato. Į langelius pripilamo konjugato tūris turi atitikti pripilamų antikūnų tirpalo tūrį.

4.3.5. Plokštelės 30 minučių laikomos uždengtos ant drėgno popieriaus kambario temperatūroje (18–25 °C).

4.3.6. Konjugato lašeliai nukratomi nuo plokštelės. Plokštelė sudrėkinama ir plaunama, kaip aprašyta 4.3.3 skirsnyje.

Atsargiai pašalinamas perteklinis vanduo.

4.3.7. Į kiekvieną tiriamąjį langelį pipete įlašinama po 5–10 µl 0,1M fosfatinio buferinio glicerino tirpalo arba komercinio priešblukinančiu aktyvumu pasižyminčio ryškintojo tirpalo (3 priedėlis), ir plokštelė uždengiama dengiamuoju stikleliu.

4.4. IF testo rezultatai:

4.4.1. Tiriamąsias plokšteles stebėti epifluorescenciniu mikroskopu naudojant filtrus, tinkamus FITC sužadinimui, ir aliejaus arba vandens imersinius tirpalus esant 500–1 000 kartų padidinimui. Langeliai stebimi per

▼M1

dvigubą skersmenį dešiniuosiuose kampuose ir aplink perimetrą. Bandinių, neturinčių arba turinčių nedaug ląstelių, atveju stebima mažiausiai 40 laukelių.

Pirmiausia stebima teigiama kontrolinė plokštelė. Ląstelės turi šviesiai fluorescuoti ir būti visiškai nusidažiusios esant nustatytam antikūnų titrui arba darbiniam praskiedimui. IF testą (4 skirsnis) reikia pakartoti, jei dažymasis nepavyko.

4.4.2. Tiriamųjų plokštelių tiriamuosiuose langeliuose stebimos šviesiai fluorescuojančios tipiškos morfologijos *C. m.* subsp. *sepedonicus* ląstelės (žr. tinklavietę http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Fluorescencijos intensyvumas privalo būti lygiavertis teigiamo kontrolinio štamo fluorescencijos intensyvumui arba net didesnis už jį esant tam pačiam antikūnų praskiedimui. Į ne visai nusidažiusias ląsteles ar silpnai fluorescuojančias ląsteles nekreipiama dėmesio.

Įtarus kokią nors taršą, testą privaloma pakartoti. Taip gali atsitikti tuo atveju, kai visose vienos partijos plokštelėse matomos teigiamos ląstelės dėl buferinio tirpalo taršos arba dėl to, kad stebimos teigiamos ląstelės (už plokštelės lango ribų) ant plokštelės dangtelio.

4.4.3. Yra keletas būdingų IF testo specifiškumo problemų. Gali pasitaikyti foninių fluorescuojančių netipiškos morfologijos ląstelių populiacijų ir į *C. m.* subsp. *sepedonicus* savo dydžiu bei morfologija panašių kryžmiškai reaguojančių saprofitinių bakterijų, randamų bulvių stiebagumbių viršūnių gabaliukų nuosėdose.

4.4.4. Tirti tik tipiško dydžio ir morfologijos fluorescuojančias ląsteles esant antikūnų titrui arba darbiniam praskiedimui, kaip nurodyta 4.3.

4.4.5. IF testo rezultatų aiškinimas:

i) Jei stebimos šviesiai fluorescuojančios tipiškos morfologijos ląstelės, apskaičiuojamas tipiškų ląstelių viename mikroskopiniame laukelyje vidurkis ir tipiškų ląstelių skaičius pakartotinai suspenduotų nuosėdų viename mililitre (4 priedėlis).

Bandiniai, kurių 1 ml yra mažiausiai $5x10^3$ tipiškų ląstelių, laikomi užkrėstais. Reikalaujama juos tirti toliau.

ii) IF testo rezultatai laikomi neigiamais, kai viename bandinių mililitre yra mažiau nei $5x10^3$ ląstelių, ir toks bandinys laikomas neigiamu. Toliau tirti nereikalaujama.

5. FLUORESCENCINĖS HIBRIDIZACIJOS IN SITU (FISH) TESTAS

Principas

Kai FISH testas taikomas kaip pirmasis atrankos testas ir nustatoma, kad jis teigiamas, IF testą reikia atlikti kaip antrąjį privalomąjį atrankos testą. Kai FISH testas taikomas kaip antrasis privalomasis testas ir nustatoma, kad jis teigiamas, yra reikalaujama atlikti paskesnį testavimą pagal vaizduojamąją diagramą tam, kad diagnozė būtų baigta.

Pastaba:

Naudoti patvirtintus oligonukleotidų, būdingų *C. m.* subsp. *sepedonicus*, bandinius (7 priedėlis). Šiuo metodu atliekant išankstinį testą, bandinių ekstraktuose, kurie anksčiau buvo neigiami, viename mililitre turėtų būti pakartotinai aptinkama mažiausiai 10^3-10^4 *C. m.* subsp. *sepedonicus* ląstelių.

Ši tvarka pirmiausia turėtų būti taikoma šviežiai paruoštam bandinio ekstraktui, tačiau ją galima taikyti ir ekstraktui, kuris buvo laikomas glicerine –16–24 °C arba –68–86 °C temperatūroje.

Bandinio ekstrakto, kuriame nenustatyta *C. m.* subsp. *sepedonicus* ląstelių, alikvotines dalis naudoti kaip neigiamus kontrolinius bandinius.

3–5 dienų amžiaus kultūrų suspensijas, turinčias *C. m.* subsp. *sepedonicus* (pvz., NCPPB 4053 arba PD 406 štamo) 0,01M fosfatiniame buferiniame tirpale 10^5-10^6 ląstelių/ml, reikėtų naudoti kaip teigiamus kontrolinius bandinius (apie paruošimą žr. 2 priedėlyje). Paruošti atskiras teigiamas kontrolines plokšteles, skirtas homologiniam arba bet kuriam etaloniniam *C. m.* subsp. *sepedonicus* štamui, suspenduotam bulvių ekstrakte, kaip nurodyta 2 priedėlyje.

FITC žyma pažymėti oligonukleotidiniai bandiniai, būdingi eubakterijoms, labai naudingi kontroliuojant hibridizavimo procesą, kadangi jais nudažomos visos bandinyje esančios eubakterijos.

▼M1

Kontrolinis bandinys tiriamas tokiu pat būdu, kaip ir tiriamasis bandinys.

5.1. **Bulvių ekstrakto fiksavimas**

Paskesnė metodika pagal Wullings *et al.* (1998):

5.1.1. Paruošti fiksavimo tirpalą (žr. 7 priedėlį).

5.1.2. Į Eppendorfo mėgintuvėlį įlašinama po 100 µl kiekvieno bandinio ekstrakto, ir mėgintuvėlis centrifuguojamas 8 min 7 000 g greičiu.

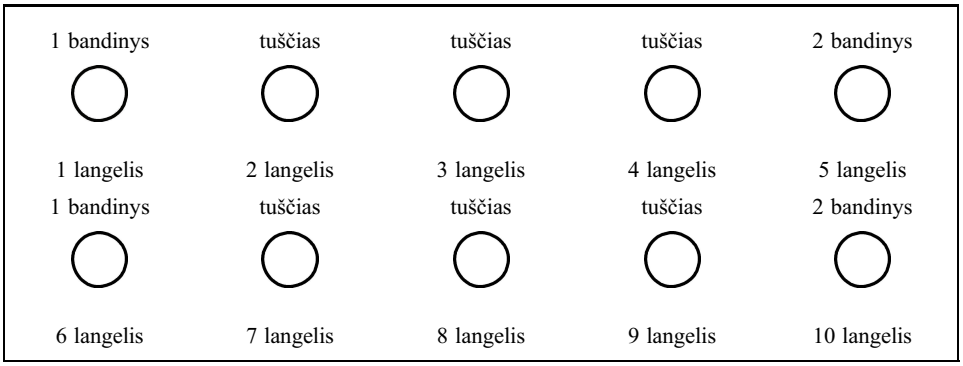
5.1.3. Nupilamas viršnuosėdinis skystis ir nuosėdos ištirpinamos 500 µl fiksavimo tirpalo, paruošto prieš mažiau kaip 24 valandas. Mėgintuvėlis sukratomas pavartant ir per naktį inkubuojamas 4° C temperatūroje.

Kita fiksuojanti medžiaga yra 96 % etanolis. Nuosėdos, gautos 5.1.2 etape, ištirpinamos 50 µl 0,01M fosfatinio buferinio tirpalo 50 µl 96 % etanolio. Mišinys apverčiamas aukštyn sumaišant ir 30–60 minučių inkubuojamas 4 °C temperatūroje.

5.1.4. Mėgintuvėlis centrifuguojamas 8 min 7 000 g greičiu, viršnuosėdinis skystis nupilamas ir nuosėdos pakartotinai suspenduojamos 75 µl 0,01M fosfatinio buferinio tirpalo (žr. 3 priedėlį).

5.1.5. Į švarios daug langelių turinčios plokštelės langelius įlašinama po 16 µl fiksuotų suspensijų taip, kaip parodyta 3 pav. Kiekviena plokštelė skiriama 2 bandiniams ištirti, įlašinus juos nepraskiestus po 10 µl, ir vėliau padaryti 1:100 praskiedimą (0,01M fosfatiniu buferiniu tirpalu). Likusį bandinio tirpalą (49 µl) galima saugoti –20 °C temperatūroje, įpylus 1 tūrį 96 % etanolio. Jei reikia pakartoti FISH testą, etanolis pašalinamas centrifuguojant ir įpilant tokį pat tūrį 0,01M fosfatinio buferinio tirpalo (sumaišoma pavartant).

3 pav. FISH testui skirtos plokštelės išklotinė



1 dengiamasis stiklelis 2 dengiamasis stiklelis

5.1.6. Plokštelės džiovinamos ore (arba plokštelių džiovintuve 37 °C temperatūroje) ir fiksuojamos liepsna.

Šiame etape darbą galima nutraukti ir hibridizavimą atlikti kitą dieną. Plokštelės turi būti nedulkėtos, ir jas reikia laikyti sausas kambario temperatūroje.

5.2. **Pasiruošimas hibridizacijai ir hibridizacija**

5.2.1. Paruošiamas lizocimo tirpalas, 10 mg lizocimo (Sigma L-6876) ištirpinus 10 ml buferinio tirpalo (100mM Tris-HCl, 50mM EDTA, pH 8,0). Šį tirpalą galima saugoti, tačiau jį užšaldyti ir atitirpdyti galima tik vieną kartą. Į kiekvieną bandiniui skirtą plokštelės langelį įlašinama po 50 µl lizocimo tirpalo, ir plokštelė 10 minučių laikoma kambario temperatūroje. Plokštelės pamerkiamos į demineralizuotą vandenį tik vieną kartą ir džiovinamos filtriniu popieriumi.

Priešingu atveju vietoj lizocimo į kiekvieną langelį galima įpilti po 50 µl 40–400µg ml^{-1} proteinazės K, ištirpintos buferiniame tirpale (20 mM Tris-HCl, 2mM $CaCl_2$, pH 7,4), ir plokštelę 30 minučių inkubuoti 37 °C temperatūroje.

5.2.2. Vanduo pašalinamas iš ląstelių, kas minutę įpilant laipsniškai didėjančios koncentracijos -50 %, 80 % ir 96 % - etanolio. Plokštelės džiovinamos oru, įdėjus jas į plokštelėms skirtą laikiklį.

▼M1

5.2.3. Parengiama drėgna inkubavimo kamera, oro nepraleidžiančios dėžės dugną uždengus sugeriamuoju arba filtriniu popieriumi, išmirkytu 1× hybmix (7 priedėlis). Dėžė mažiausiai 10 minučių paliekama hibridizavimui skirtoje krosnelėje 55 °C temperatūroje.

5.2.4. Paruošti hibridizacijos tirpalą (7 priedėlis), į vienos plokštelės langelius įpylus 45µl ir 5 minutes atliekant išankstinį inkubavimą 55 °C temperatūroje.

5.2.5. Plokštelės padedamos ant karšto 45 °C temperatūros padėklo ir į kiekvienos plokštelės 4 langelius įpilama po 10 µl hibridizavimo tirpalo.

5.2.6. Kiekviena plokštelė uždengiama dviem dengiamaisiais stikleliais (24 × 24 mm), kad neprasiskverbtų oras. Plokštelės sudedamos į pašildytą drėgną kamerą ir per naktį krosnelėje 55 °C temperatūroje tamsoje atliekamas hibridizavimas.

5.2.7. Į tris laboratorines kolbas įpilama po 1 l ypač gryno vandens (YGV), 1 l 1x hybmix tirpalo (334 ml 3x hybmix ir 666 ml YPV) ir 1 l 1/2x hybmix (167 ml 3x hybmix ir 833 ml YGV). Kiekviena kolba pašildoma 55 °C temperatūros vandens vonioje.

5.2.8. Plokštelės atidengiamos ir įdedamos į plokštelių laikiklį.

5.2.9. Bandinio perteklius pašalinamas 15 minučių inkubuojant plokštelę laboratorinėje kolboje 55 °C temperatūroje, į kurią įpilama vienąkart koncentruoto hybmix tirpalo

5.2.10. Plokštelių laikiklis pamerkiamas į 1/2 koncentracijos hybmix plovimo tirpalą ir dar 15 minučių inkubuojamas.

5.2.11. Plokštelės trumpam pamerkiamos į YGV ir padedamos ant filtrinio popieriaus. Perteklinis vanduo pašalinamas, paviršių padengiant filtriniu popieriumi. Į kiekvieną langelį pipete įlašinama po 5–10 µl priešblukinančiu aktyvumu pasižyminčio ryškintojo tirpalo (pvz., *Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA* arba jam lygiaverčio) ir visa plokštelė uždengiama viena (24 × 60 mm) dengiamuoju stikleliu.

5.3. **FISH testo rezultatų aiškinimas**

5.3.1. Plokšteles, pamerktas į imersinį aliejų, nedelsiant stebėti mikroskopu, tinkančiu epifluorescencinei mikroskopijai ir padidinus 630 ir 1000 kartų. Bandinyje esančios eubakterinės ląstelės (įskaitant Gram(-) ląsteles), stebimos per fluoresceino izotiocianatui (FITC) tinkamą filtrą, atrodo fluorescuojančiai žaliai. Cy3 dažu dažytos *C. m.* subsp. *sepedonicus* ląstelės, stebimos per tetrametilrodamino-5-izotiocianatui skirtą filtrą, atrodo fluorescuojančiai raudonai. Palyginti tiriamųjų ir teigiamų kontrolinių ląstelių morfologiją. Ląstelės turi fluorescuoti šviesia spalva ir būti visiškai nusidažiusios. FISH testą (9.4 skirsnis) reikia pakartoti, jei dažymasis nepavyko. Langeliai stebimi per dvigubą skersmenį dešiniuosiuose kampuose ir aplink perimetrą. Jei bandiniai neturi ląstelių arba turi jų nedaug, stebima mažiausiai 40 laukelių.

5.3.2. Stebėti būdingos morfologijos šviesiai fluorescuojančias *C. m.* subsp. *sepedonicus* ląsteles tiriamųjų plokštelių tiriamuosiuose langeliuose (žr. tinklavietę http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Fluorescencijos intensyvumas privalo būti lygiavertis arba net didesnis už teigiamo kontrolinio štamo fluorescencijos intensyvumą. Į ne visai nusidažiusias ląsteles ar silpnai fluorescuojančias ląsteles nekreipiama dėmesio.

5.3.3. Įtarus bet kokią taršą, testą privaloma pakartoti. Taip gali atsitikti tuo atveju, kai visose vienos partijos plokštelėse matomos teigiamos ląstelės dėl buferinio tirpalo taršos arba dėl to, kad stebimos teigiamos ląstelės (už plokštelės langelio ribų) ant plokštelės dangtelio.

5.3.4. Yra keletas būdingų FISH testo specifiškumo problemų. Gali pasitaikyti foninių fluorescuojančių netipiškos morfologijos ląstelių populiacijų ir į *C. m.* subsp. *sepedonicus* savo dydžiu bei morfologija panašių kryžmiškai reaguojančių saprofitinių bakterijų, nors tokie atvejai gerokai retesni nei IF testo atveju tiriant bulvių stiebagumbių viršūnės gabaliukų segmentų nuosėdas.

5.3.5. Tirti tik tipiško dydžio ir morfologijos fluorescuojančias ląsteles, žr. 5.3.2 skirsnį.

5.3.6. FISH testo rezultato aiškinimas:

i) Teigiami FISH testo rezultatai gaunami tada, kai per FITC filtrą stebimos tipiško dydžio bei morfologijos šviesiai žaliai fluorescuojančios *C. m.* subsp. *sepedonicus* ląstelės, ir per rodamino filtrą stebimos visos teigiamos kontrolinės ląstelės fluorescuoja šviesiai

▼M1

raudona spalva, o tarp neigiamų kontrolinių ląstelių jokios fluorescencijos nėra. Jei randama šviesiai fluorescuojančių būdingos morfologijos ląstelių, apskaičiuojamas tipiškų ląstelių viename mikroskopiniame laukelyje vidurkis ir tipiškų ląstelių skaičius pakartotinai suspenduotų nuosėdų viename mililitre (4 priedėlis). Bandiniai, kurių 1 ml yra mažiausiai 5×10^3 tipiškų ląstelių, laikomi užkrėstais. Reikalaujama juos tirti toliau. Bandiniai, kurių pakartotinai suspenduotų nuosėdų 1 ml yra mažiau kaip 5×10^3 tipiškų ląstelių, laikomi neigiamais.

ii) FISH testas yra neigiamas tada, kai per rodamino filtrą tipiško dydžio ir morfologijos šviesiai raudonai fluorescuojančios *C. m.* subsp. *sepedonicus* nėra stebimos, jei šviesiai raudonai fluorescuojančios ląstelės per rodamino filtrą stebimos teigiamuose kontroliniuose bandiniuose.

6. POLIMERAZĖS GRANDININĖS REAKCIJOS (PGR) TESTAS

Principai

Kai PGR testas atliekamas kaip pagrindinis atrankos testas ir gaunami teigiami rezultatai, yra būtina atlikti IF testą kaip antrą privalomąjį atrankos testą. Kai PGR testas atliekamas kaip antras atrankos testas ir gaunami teigiami rezultatai, tai paskesnį testavimą reikia atlikti pagal vaizduojamąją diagramą tam, kad diagnozė būtų baigta.

Šio metodo, kaip pagrindinio atrankos testo, visas galimybes rekomenduojama panaudoti tik įgijus atitinkamos patirties.

Pastaba:

Šiuo metodu atliekant išankstinį testą, bandinių ekstraktuose, kurie anksčiau buvo neigiami, viename mililitre turėtų būti pakartotinai aptinkama mažiausiai 10^3-10^4 *C. m.* subsp. *sepedonicus* ląstelių. Gali būti reikalaujama atlikti optimizavimo eksperimentus, kad visose laboratorijose būtų pasiektas didžiausias nustatymo jautrumas ir specifiškumas.

Naudoti patvirtintus PGR reagentus ir metodikas. Pirmiausia pasirinkti metodą, kurį taikant naudojamas vidinis kontrolinis bandinys.

Imtis atitinkamų atsargumo priemonių, siekiant išvengti bandinio užteršimo tiriamaja DNR. PGR testą turėtų atlikti patyręs molekulinės biologijos laboratorijų techninis personalas, kad būtų sumažinta taršos tiriamąja DNR galimybė.

Neigiami kontroliniai bandiniai (DNR išskyrimo ir PGR procedūroms) turėtų visada būti laikomi galutiniais bandiniais, kuriais įrodoma, ar įvyko tarša DNR.

Atliekant PGR testą reikėtų naudoti šiuos neigiamus kontrolinius bandinius:

— bandinio ekstraktą, kuris atlikus ankstesnį tyrimą buvo laikomas neužkrėstas *C. m.* subsp. *sepedonicus*,

— buferinius kontrolinius tirpalus, naudojamus iš bandinio išskirti bakterijai ir DNR,

— PGR reakcinį mišinį.

Reikėtų naudoti šiuos teigiamus kontrolinius bandinius:

— pakartotinai suspenduotų nuosėdų, į kurias pridėta *C. m.* subsp. *sepedonicus*, alikvotines dalis (apie paruošimą žr. 2 priedėlyje),

— virulentiško *C. m.* subsp. *sepedonicus* izoliato (pvz., NCPPB 2140 arba NCPPB 4053)10^6/ml ląstelių vandeninę suspensiją,

— jei įmanoma, atliekant PGR testą taip pat reikėtų naudoti iš teigiamų kontrolinių bandinių išskirtą DNR.

Siekiant išvengti galimos taršos, tiriamieji teigiami kontroliniai bandiniai paruošiami atskirai nuo tiriamųjų bandinių.

Reikėtų stengtis, kad bandinių ekstraktuose nebūtų dirvožemio. Todėl tam tikrais atvejais rekomenduotina ekstraktus paruošti naudojant plautas bulves, jei dirbama pagal PGR metodikas.

6.1. **DNA gryninimo metodai**

Naudoti teigiamus ir neigiamus kontrolinius bandinius, kaip aprašyta pirmiau.

Kontrolinę medžiagą paruošti taip pat, kaip ir bandinį.

▼**M1**

Tiriamoji DNR iš sudėtingų bandinių substratų išskiriama įvairiais metodais, taigi PGR ir kitų fermentinių reakcijų inhibitoriai pašalinami ir tiriamoji DNT sukoncentruojama bandinio ekstrakte.

Paskesnis metodas buvo optimizuotas tam, kad būtų atliekama patvirtinta PGR, aprašyta 6 priedėlyje.

6.1.(a) Pastrick (2000) metodas:

1. 220 µl lizės buferinio tirpalo (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) įlašinti į 1,5 ml tūrio Eppendorf mėgintuvėlį.
2. Įpilti 100 µl bandinio ekstrakto ir mėgintuvėlį 10 minučių laikyti termostate arba vandens vonelėje 95 °C temperatūroje.
3. Mėgintuvėlį 5 minutes palaikyti lede.
4. Įpilti 80 µl lizocimo pradinio tirpalo (50 mg lizocimo/ml 10 mM Tris HCl, pH 8,0 buferiniame tirpale) ir 30 minučių inkubuoti 37 ° C temperatūroje.
5. Įpilti 220 µl *Easy DNA®* tirpalo A (*Invitrogen*), gerai sukratyti ir 30 minučių inkubuoti 65 °C temperatūroje.
6. Įpilti 100 µl *Easy DNA®* tirpalo B (*Invitrogen*), intensyviai kratyti, kol nuosėdos išsisklaidys mėgintuvėlyje ir bandinys taps vienodai klampus.
7. Įpilti 500 µl chloroformo ir kratyti tol, kol sumažėja klampumas ir mišinys tampa homogeniškas.
8. 20 minučių centrifuguoti 15 000 g greičiu 4 °C temperatūroje, kad būtų atskirtos fazės ir susidarytų interfazė.
9. Perpilti viršutinę fazę į naujai paruoštą Eppendorf mėgintuvėlį.
10. Įpilti 1 ml 100 % etanolio (–20 °C), trumpai pakratyti ir 10 minučių inkubuoti lede.
11. 20 minučių centrifuguoti 15 000 g greičiu 4 °C temperatūroje ir iš nuosėdų pašalinti etanolį.
12. Įpilti 500 µl 80 % etanolio (–20 °C) ir sumaišyti, pavartant mėgintuvėlį.
13. 20 minučių centrifuguoti 15 000 g greičiu 4 °C temperatūroje ir išsaugoti nuosėdas bei pašalinti etanolį.
14. Leisti nuosėdoms išdžiūti ore arba greitajame DNR siurblyje.
15. Pakartotinai suspenduoti nuosėdas 100 µl steriliame ypač gryname vandenyje ir mažiausiai 20 minučių palikti kambario temperatūroje.
16. Kol bus atliekama PGR, laikyti –20 °C temperatūroje.
17. Centrifuguojant išsodinti bet kurį baltos spalvos precipitatą ir 5 µl supernatanto, turinčio DNR, panaudoti PGR atlikti.

6.1.(b) Kiti metodai

Kiti DNR išskyrimo metodai (pvz., naudojant bendrovės *Qiagen DNeasy* rinkinį, skirtą augalų DNR išskirti) galėtų būti taikomi, jei įrodoma, kad jie tokie pat efektyvūs išskiriant DNR iš kontrolinių bandinių, kurių 1 ml yra 10^3-10^4 patogeno ląstelių.

6.2. **PGR**

6.2.1. Tiriamosios ir kontrolinės matricos paruošiamos PGR pagal patvirtintą metodiką (6 priedėlis). Bandinio DNR ekstraktas praskiedžiamas ypač grynu vandeniu santykiu 1:10.

6.2.2. Pagal paskelbtą metodiką paruošiamas atitinkamas PGR reakcinis mišinys taršai atsparioje aplinkoje (6 priedėlis). Patvirtinta PGR yra daugybinė reakcija, kurią atliekant taip pat naudojamas vidinis PGR kontrolinis bandinys.

6.2.3. Į 25 µl PGR reakcinio mišinio, esančio steriliuose PGR skirtuose mėgintuvėliuose, įpilama 5 µl DNR ekstrakto.

6.2.4. Naudojamas neigiamas kontrolinis bandinys, sudarytas tik iš PGR reakcinio mišinio, ir vietoj bandinio į jį įpilama ypač gryno vandens, kuris naudojamas ir PGR mišinyje.

6.2.5. Mėgintuvėliai įdedami į ta patį PGR reaktorių, kuris buvo naudojamas atliekant išankstinį tyrimą, ir atliekama atitinkamai optimizuota PGR (6 priedėlis).

▼M1

6.3. **PGR produkto analizė**

6.3.1. Padaugintos matricinės DNR bandiniai analizuojami elektroforezės agarozės gelyje metodu. Į gelį įnešama mažiausiai po 12 µl padauginto DNR reakcinio mišinio, sumaišyto su 3 µl įnešimo buferinio tirpalo (6 priedėlis). Naudojami 2 % (svoris/tūris) agarozės geliai, pagaminti taikant tris-acetato-EDTA (TAE) buferinį tirpalą (6 priedėlis), ir elektroforezė atliekama esant 5–8 V/cm. Naudojama atitinkamo ilgio DNR žymė, pvz., 100bp ilgio fragmentas.

6.3.2. DNR juostelės išryškinamos 30–45 minutes dažant etidiumo bromido dažu (0,5 mg/l); *dirbant su šiuo mutagenu yra imamasi atsargumo priemonių.*

6.3.3. Gelis apžiūrimas apšvietus jį trumpųjų UV bangų peršvietėju (pvz., bangos ilgiui siekiant λ = 302 nm), stebimi numatomo ilgio padaugintos DNR fragmentai (6 priedėlis), ir stebėjimai užrašomi.

6.3.4. Gavus naujų duomenų arba esant naujiems atvejams, padaugintos DNR tapatybė nustatoma, atliekant likusios padaugintos DNR restrikcinę analizę, DNR inkubuojant atitinkamo fermento ir buferinio tirpalo mišinyje kambario temperatūroje (žr. 6 priedėlį). Suskaldyti fragmentai analizuojami agarozės gelio elektroforezės metodu ir stebimas būdingas restrikcijos fragmentas, gelį nudažius etidiumo bromidu ir apšviečiant UV peršvietėju, bei palyginant su nesuskaldytu ir suskaldytu teigiamu kontroliniu bandiniu.

PGR testo rezultato aiškinimas:

PGR testas yra neigiamas, jei tiriamajame bandinyje nenustatomas numatomo dydžio padaugintos *C. m.* subsp. *sepedonicus* būdingos DNR fragmentas, bet jis nustatomas visuose teigiamuose kontroliniuose bandiniuose (kai daugybinė PGR atliekama naudojant augalui būdingus vidinius kontrolinius pradmenis, antrąjį numatomą PGR produktą reikia padauginti kartu su tiriamuoju bandiniu).

PGR testas yra teigiamas, jei aptinkamas numatomo dydžio padaugintos *C. m.* subsp. *sepedonicus* būdingos DNR fragmentas, suskaldytas restriktaze (kai reikalaujama), ir jei jis negaunamas iš bet kurio neigiamo kontrolinio bandinio. Patikimas teigiamo rezultato patvirtinimas gali būti gaunamas pakartojant testą ir naudojant antrąjį DNR pradmenų rinkinį (9.3 skirsnis).

Pastaba:

PGR inhibiciją galima įtarti, jei padaugintos matricinės DNR fragmetas gaunamas iš teigiamo kontrolinio bandinio, turinčio *C. m.* subsp. *sepedonicus* vandenyje, tačiau neigiami rezultatai gaunami naudojant teigiamą kontrolinį bandinį, turintį *C. m.* subsp. *sepedonicus* bulvių ekstrakte. Kai daugybinė PGR atliekama naudojant vidinius PGR kontrolinius bandinius, reakcijos inhibicija stebima negavus abiejų padaugintų matricinių DNR.

Užsikrėtimą galima įtarti, jei numatoma padauginta DNR gaunama iš vieno arba daugiau neigiamų kontrolinių bandinių.

7. BIOTESTAS

Pastaba:

Šiuo metodu išankstinį tyrimą atliekant bandinių ekstraktuose, kurie anksčiau buvo neigiami, 1 ml turėtų būti galima nustatyti 10^3-10^4 *C. m.* subsp. *sepedonicus* kolonijas sudarančių vienetų (apie paruošimą žr. 2 priedėlyje).

Didžiausio nustatymo jautrumo galima tikėtis, kai naudojamas šviežiai paruoštas bandinio ekstraktas ir laikomasi optimalių augimo sąlygų. Tačiau šį metodą galima sėkmingai taikyti tiriant ekstraktus, laikytus glicerine –68–86 °C temperatūroje.

Kai kurios baklažanų veislės yra puiki *C. m.* subsp. *sepedonicus* dauginimosi terpė net ir nesant simptomų ir yra puikus bakterijos šeimininko patvirtinimo testas.

Augimo sąlygas reikėtų optimizuoti, kad būtų sumažintas netikrų neigiamų rezultatų gavimo pavojus.

Dėl auginimo žr. 8 priedėlį.

7.1. Likusią pagal 3.1.6 arba 3.2.5 skirsnį pakartotinai suspenduotų nuosėdų alikvotinę dalį paskirstyti tarp baklažanų taikant vieną iš toliau pateikiamų metodų (7.3 arba 7.4 skirsnis). Naudoti tik 2–3 lapelių stadijos augalus ir sudaryti sąlygas visiškai pasiekti trečiojo tikrojo lapelio stadiją. Kad būtų visiškai sunaudota pakartotinai

▼M1

suspenduotų nuosėdų likusi dalis ir būtų efektyviai atliktas toliau aprašytas inokuliavimas, reikia, kad vieną bandinį sudarytų 15-25 baklažanai.

7.2. Baklažanai 1–2 dienas prieš inokuliavimą nelaistomi, kad būtų sumažintas turgorinis lapų slėgis.

7.3. Inokuliavimas įpjovos vietoje

7.3.1. Laikant augalą dviem pirštais, suspenduotų nuosėdų lašas (apytiksliai 5–10 µl) užlašinamas ant stiebo tarp sėklaskilčių ir pirmojo lapelio.

7.3.2. Steriliu skalpeliu padaromas įstrižinis 1 cm ilgio ir 2/3 stiebo storio gylio pjūvis nuo tos vietos, kur buvo užlašintas suspenduotų nuosėdų lašas.

7.3.3. Pjūvis užsandarinamas steriliu vazelinu, tam naudojant švirkštą.

7.4. Inokuliavimas švirkštu

Baklažanų stiebai virš sėklaskilčių inokuliuojami, tam naudojant švirkštą su hipodermine adata (ne mažiau kaip 23G). Bandinys padalijamas po lygiai visuose baklažanuose.

7.5. Kaip teigiami kontroliniai augalai, 5 baklažanai inokuliuojami žinomos *C. m.* subsp. *sepedonicus* kultūros 10^5–10^6 ląstelių/ml vandenine suspensija ir, kai įmanoma, užkrėstu stiebagumbio audiniu (4 skirsnis), taikant tą patį inokuliavimo metodą (žr. 7.3 arba 7.4 skirsnį).

7.6. Kaip neigiami kontroliniai augalai, 5 baklažanai steriliu nuosėdų buferiniu tirpalu inokuliuojami taikant tą patį metodą (7.3 arba 7.4 skirsnis).

7.7. Augalai 4 savaites 18–24 °C temperatūroje laikomi karantino sąlygomis. Augalai auginami esant pakankamai šviesos ir drėgmės (70–80 %) ir vandens, kad nepermirktų ar nenuvystų dėl vandens trūkumo. *C. m. sepedonicus* ląstelės žūva esant aukštesnei kaip 30 °C temperatūrai, o jų optimali temperatūra yra 21 °C. Siekiant išvengti taršos, teigiami kontroliniai ir neigiami kontroliniai augalai auginami aiškiai atskirtuose loveliuose šiltnamyje arba auginimui skirtoje patalpoje, o jei trūksta erdvės, tai užtikrinama atskirtis. Jei skirtingais bandiniais inokuliuojamus augalus reikia auginti kartu, jie atskiriami skydeliais. Tręšimo, laistymo, patikrinimo ir kitų operacijų metu labai rūpinamasi, kad būtų išvengta kryžminio užsikrėtimo. Būtina užtikrinti, kad į šiltnamius ir auginimui skirtas patalpas nepatektų jokie vabzdžiai kenkėjai, nes jie perneša bakteriją nuo vieno bandinio prie kito.

7.8. Simptomai pradedami reguliariai stebėti po savaitės. Suskaičiuojami simptomų turintys augalai. *C. m.* subsp. *sepedonicus* sukelia baklažanų lapų vytimą, dėl kurio lapų pakraščiuose arba tarpgyslinėse vietose audinys ima nykti. Suvytęs audinys iš pradžių gali būti tamsiai žalias arba taškuotas, tačiau vėliau dėl vytimo, prieš virsdamas nekrotiniu audiniu, jis pabąla. Tarpgysliniai vytuliai atrodo taip, lyg būtų permirkę riebaluotu vandeniu. Nekrotinio audinio kraštai dažnai būna ryškiai geltoni. Augalai gali įveikti infekciją. Augalai nebūtinai sunyksta; kuo ilgiau simptomai vystosi, tuo didesnė išgyvenimo galimybė. Jauni baklažanai nedidelėms *C. m.* subsp. *sepedonicus* populiacijoms mažiau atsparūs nei senesni augalai, todėl būtina naudoti augalus, esančius trečioje lapelio stadijoje arba jos dar nepasiekusius.

Vytulių atsiradimą gali sukelti ir kitos stiebagumbių audinyje esančios bakterijos ir grybai. Joms priklauso *Ralstonia solanacearum, Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ir *E. carotovora* subsp. *atroseptica, Erwinia chrysanthemi, Phoma exigua* var. *foveata*, taip pat ir gausios saprofitinių bakterijų populiacijos. Ypač *Erwinia chrysanthemi* gali sukelti lapų vytulius, labai panašius į *C. m. sepedonicus* sukeliamus vytulius. Vienintelis skirtumas yra stiebų patamsėjimas užkrėtimo *Erwinia chrysanthemi* atveju. Kitus vytulius nuo *C. m.* subsp. *sepedonicus* sukeliamų vytulių galima atskirti pagal tai, kad visi lapai ir augalas labai greitai vysta. Atskirti galima ir pagal dažymąsi Gramo būdu: šiuo testu užkrėtimą *C. m.* subsp. *sepedonicus* galima atskirti nuo užkrėtimo *Erwinia* spp.

7.9. Baklažanuose pastebėjus simptomų, reikėtų pakartoti išskyrimą, tam panaudojant augalų suvytusių lapų audinio arba stiebo audinio dalį (žr. 3.1.3 skirsnį apie audinio išmirkymą). Baklažanų lapų ir stiebų paviršiai suvilgomi 70 % etanoliu. Atliekamas IF arba PGR testas, jam naudojant baklažano sultis, ir atliekamas išskyrimas tinkamoje (selektyvioje) terpėje (žr. 8 skirsnį). Galima dažyti ir pagal Gramą (9 priedėlis). Identifikuojamos įtariamos išgrynintos *C. m.* subsp. *sepedonicus* ir patvirtinamas patogeniškumas (žr. 9 ir 10 skirsnius).

▼M1

7.10. Tam tikromis sąlygomis, ypač kai augimo sąlygos nėra optimalios, yra galimybė, kad *C. m.* subsp. *sepedonicus* baklažanuose sukels latentinę infekciją net praėjus 4 savaičių trukmės inkubaciniam laikotarpiui. Jei po 4 savaičių simptomai nėra stebimi, atliekamas 1 cm ilgio stiebo dalies sudėtinio bandinio, paimto iš aukščiau nei inokuliacijos vieta, IF/PGR testas. Jei testo rezultatai teigiami, reikėtų 8 skirsnyje nurodyta tvarka atlikti pakartotinį išskyrimą tinkamoje (selektyvioje) terpėje. Identifikuojamos įtariamos išgrynintos *C. m.* subsp. *sepedonicus* ir patvirtinamas patogeniškumas (žr. 9 ir 10 skirsnius).

Biotesto rezultatų aiškinimas

Biotesto tinkami rezultatai gaunami, kai teigiamuose kontroliniuose augaluose pasireiškia tipiški simptomai ir iš šių augalų galima pakartotinai išskirti bakterijas, o neigiamuose kontroliniuose augaluose simptomai nėra pastebimi.

Biotestas yra neigiamas, jei tiriamieji augalai nėra užkrėsti *C. m.* subsp. *sepedonicus*, ir laikomasi nuostatos, kad *C. m.* subsp. *sepedonicus* nustatomas teigiamuose kontroliniuose augaluose.

Biotestas yra teigiamas, jei tiriamieji augalai yra užkrėsti *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

8. *C. M.* SUBSP. *SEPEDONICUS* IŠSKYRIMAS

Pastaba:

Diagnozė baigiama tik tuo atveju, jei *C. m.* subsp. *sepedonicus* išskiriamas ir vėliau yra identifikuojamas (žr. 9 skirsnį) ir patvirtinamas patogeniškumas (10 skirsnis). Nors *C. m.* subsp. *sepedonicus* yra išrankus organizmas, jį galima išskirti iš simptominio audinio.

Tačiau jo augimą gali užmaskuoti peraugusios saprofitinės bakterijos, todėl tiesioginis išskyrimas iš stiebagumbio arba stiebo audinio nuosėdų yra sudėtingas (žr. 3.1.6 arba 3.2.5 skirsnį). Naudojant atrankinę terpę ir atitinkamai praskiedžiant pakartotinai suspenduotas bulvių stiebagumbių viršūnės gabaliukų nuosėdas, galima atlikti tiesioginį *C. m.* subsp. *sepedonicus* išskyrimą.

Išskirti reikia iš visų simptominių bulvių stiebagumbių ar stiebo segmentų ir iš baklažanų, kuriuose simptomai nebuvo stebimi, tačiau sudėtinio bandinio IF/PGR testo rezultatai buvo teigiami (žr. 7.10 skirsnį). Kai būtina, baklažanų stiebai išmirkomi 3.1.3 skirsnyje aprašyta tvarka.

Ruošiant teigiamus kontrolinius bandinius, yra atliekami *C. m.* subsp. *sepedonicus* štamų (pvz., NCPPB 4053 arba PD 406) 10^6 ksv/ml ląstelių suspensijos praskiedimai 1:10. Siekiant išvengti taršos, teigiami kontroliniai bandiniai paruošiami atskirai nuo tiriamųjų bandinių.

Kiekvienos selektyvios terpės partija prieš pradedant įprastinių bandinių tyrimą patikrinama pagal patogeno gebėjimą augti joje.

Kontrolinė medžiaga tiriama taip pat, kaip ir bandinys.

8.1. **Selektyvus pasėjimas į lėkšteles**

8.1.1. 100 µl tūrio pakartotinai suspenduotas bulvių nuosėdų bandinys arba baklažanų sultys nuosėdų buferiniame tirpale praskiedžiamos praskiedimo 1:10 principu. (3 priedėlis).

8.1.2. Išskyrimas iš nepraskiestų bulvių nuosėdų paprastai būna nesėkmingas dėl *C. m.* subsp. *sepedonicus* išrankaus augimo ir saprofitinių bakterijų konkurencijos. Kadangi užkrėstuose audiniuose bakterijos populiacija būna gausi, saprofitus galima pašalinti patogenui išliekant. Todėl rekomenduojama 100 µl kiekvieno bandinio praskiesti santykiu nuo 1:100 iki 1:10 000 MTNA arba NCP-88 terpėje (5 priedėlis) (jei naudojamos 90 mm skersmens Petri lėkštelės, tai tūris modifikuojamas, naudojant kitų dydžių plokšteles), naudojant skleistukus (L formos lazdeles) ir taikant paskleidimo lėkštelėje metodą.

Pastaba:

Kitas būdas yra 100 µl bulvių nuosėdų alikvotinės dalies pasėjimas paskleidimo būdu pirmoje agaru užpildytoje lėkštelėje, naudojant skleistuką, kuris vėliau perkeliamas į antrą lėkštelę, nuo jo pašalinant bet kokias nuosėdas ruožuojant; galiausiai ši operacija pakartojama trečioje lėkštelėje, sukuriant praskiedimo persėjimo į lėkšteles būdu efektą, tam naudojant skleistuką.

8.1.3. Plokštelės inkubuojamos tamsoje 21–23 ^{0}C temperatūroje.

▼M1

8.1.4. Atliekant pradinius tyrimus po 3 dienų nustatomas į *C. m.* subsp. *sepedonicus* panašių kolonijų skaičius, vėliau jis nustatomas po 5, 7 ir galiausiai po 10 dienų.

8.2. **Įtariamų kolonijų gryninimas**

Pastaba:

Į *C. m.* subsp. *sepedonicus* panašių kolonijų persėjimą reikėtų atlikti MGT terpėje baklažano inokuliacijai ir (arba) paskesniam identifikavimui; tai turėtų būti atliekama prieš kolonijų peraugimą lėkštelėse, pvz., geriausia po 3–5 dienų.

8.2.1. Persėti į *C. m.* subsp. *sepedonicus* panašias kolonijas į vieną iš šių terpių: (jų sudėtis aprašyta 5 priedėlyje):

mitybinės dekstrozės agarą (tik persėjimui),

mielių peptono gliukozės agarą,

mielių ekstrakto mineralinių druskų agarą.

Inkubuoti 21–24 °C temperatūroje iki 10 dienų.

C. m. subsp. *sepedonicus* auga lėtai, dažnai per 10 dienų sudaro smeigtuko pavidalo kreminės spalvos skliautiškai išsidėsčiusias kolonijas (*C. m.* subsp. *sepedonicus* tipiškų kolonijų nuotraukų galima rasti tinklavietėje http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

8.2.2. Dar kartą persėti siekiant sukurti gryną kultūrą.

Augimo greitį galima padidinti persėjimu. Tipiškos kolonijos yra balto kremo arba dramblio kaulo spalvos, retkarčiais geltonos spalvos, apvalios, lygios, išsipūtusios, sudarančios skliautą, gleivėtos, turinčios lygius kraštus, jų skersmuo yra 1-3 mm.

Paskesniam testavimui kolonijos atrenkamos jas dažant Gramo būdu (9 priedėlis).

8.2.3. Įtariamas kolonijas identifikuoti (9 priedėlis) ir atlikti jų patogeniškumo testą (10 priedėlis).

9. IDENTIFIKAVIMAS

Įtariamų *C. m.* subsp. *sepedonicus* izoliatų grynos kolonijos identifikuojamos taikant bent du testus, pagrįstus skirtingais biologiniais principais.

Atliekant kiekvieną testą, naudojami atitinkami etaloniniai štamai.

9.1. **Mitybiniai ir fermentiniai identifikavimo testai**

Fenotipinės savybės, kurios paprastai stebimos arba nėra stebimos *C. m.* subsp. *sepedonicus* atveju, nustatomos Lelliott ir Stead (1987), Klement *et al.* (1990), Schaad (2001) ir anoniminio autoriaus (1987) aprašytais metodais.

Visos terpės turėtų būti inkubuojamos 21 °C temperatūroje ir, praėjus šešioms dienoms, tiriamos. Jei kolonijos neauga, terpės inkubuojamos dar 20 dienų.

Visi testai privalo būti atliekami naudojant žinomą *C. m.* subsp. *sepedonicus* kontrolinį bandinį. Atliekant mitybinius ir fiziologinius testus, naudojamas inokuliatas, persėtas į mitybinį agarą. Morfologinį palyginimą privaloma atlikti naudojant dekstrozės agare auginamas kolonijas.

Testai	*Numatomas rezultatas*
Oksidacijos/fermentacijos(O/F) testas	Inertiškas arba silpnaihidrolizuojasi
Oksidazės aktyvumas	–
Augimas 37 °C temperatūroje	–
Ureazės aktyvumas	–
Aeskulino hidrolizė	+
Krakmolo hidrolizė	– arba silpna hidrolizė
Tolerancija 7 % NaCl	–
Indolo sintezė	–
Katalazės aktyvumas	+
H_2S sintezė	–

▼M1

Testai	*Numatomas rezultatas*
Citrato sunaudojimas	–
Želatinos suskystėjimas	–
Rūgštis iš glicerino	–
Rūgštis iš laktozės	– arba silpnas
Rūgštis iš ramnozės	–
Rūgštis iš salicino	–
Dažymasis pagal Gramą (9 priedėlis)	+

9.2. **IF testas**

a) Paruošti apytiksliai 10^6 ląstelių/1 ml IF buferinio tirpalo suspensiją (3 priedėlis).

b) Paruošti dukart skiestų atitinkamų antiserumų serijas.

c) Atlikti imunofluorescencinį testą (4 skirsnis).

d) Imunofluorescencinio testo rezultatas laikomas teigiamu, jei jo metu nustatytas kultūros titras yra lygiavertis teigiamo kontrolinio bandinio titrui.

9.3. **PGR testas**

a) Paruošti apytiksliai 10^6 ląstelių/1 ml suspensiją ypač gryname vandenyje.

b) 100 µl ląstelių suspensijos 4 minutes uždaruose mėgintuvėliuose termostate arba vandens vonelėje pakaitinti 100 °C temperatūroje. Jei reikia, pridėti šviežiai paruošto NaOH, kad būtų pasiekta 0,05M galutinė koncentracija ir įvyktų ląstelių lizė. Po to bandinius galima saugoti –16–24 °C temperatūroje tol, kol jų prireiks.

c) Atitinkamomis PGR procedūromis padauginami *C..m.* subsp. *sepedonicus* būdingi matricinės DNR fragmentai (pvz., Pastrik, 2000; žr. 4 priedėlį; Li ir de Boer, 1995; Mills *et al.*, 1997; Pastrik ir Rainey, 1999; Schaad *et al.*, 1999).

d) *C. m.* subsp. *sepedonicus* identifikuojama, jei padauginti matricinės DNR fragmentai yra to paties dydžio ir pasižymi tuo pačiu restrikcinio fragmento ilgio polimorfizmu, kaip ir teigiamas kontrolinis štamas.

9.4. **FISH testas**

a) Paruošti apytiksliai 10^6 ląstelių/1 ml suspensiją ypač gryname vandenyje.

b) Taikyti FISH procedūrą (žr. 5 skirsnį).

c) FISH testo teigiamas rezultatas gaunamas, jei tiriant kultūrą ir teigiamą kontrolinį bandinį gaunamas tas pats rezultatas.

9.5. **Riebiųjų rūgščių tipo nustatymas (FAP)**

a) 72 valandas auginti kultūrą triptikazės sojos agare (Oxoid) 21 °C (+/– 1°) temperatūroje.

b) Riebiųjų rūgščių tipą nustatyti taip, kaip nurodyta (Janse, 1991; Stead, 1992).

c) Riebiųjų rūgščių tipo nustatymo testo teigiamas rezultatas gaunamas, jei įtariamos kultūros riebiųjų rūgščių tipas atitinka teigiamo kontrolinio bandinio riebiųjų rūgščių tipą. *C. m. sepedonicus* būdingos riebiosios rūgštys yra 15:1 Anteiso A, 15:0 Iso, 15:0 Anteiso, 16:0 Iso, 16:0 ir 17:0. Kitos gentys, tokios kaip *Curtobacterium, Arthrobacter* ir *Micrococcus*, taip pat turi keletą šių rūgščių, tačiau 15:1 Anteiso A yra retai tarp šių bakterijų pasitaikanti riebioji rūgštis, nors visose *Clavibacter* spp. pasitaiko apie 1–5 %. *C. m. sepedonicus* atveju ši rūgštis pasitaiko apie 5 %.

9.6. **Bakterijos pasikartojančių sekų BOX padauginimas PGR metodu**

a) Paruošti apytiksliai 10^6 ląstelių/1 ml suspensiją ypač gryname vandenyje.

b) Testą atlikti taip, kaip nurodyta (Smith *et al.*, 2001).

10. PATVIRTINIMO TESTAS

Patogeniškumo testą privaloma atlikti galiausiai diagnozuojant *C. m.* subsp. *sepedonicus* ir įvertinant kultūrų, identifikuojamų kaip *C. m.* subsp. *sepedonicus*, virulentiškumą.

▼**M1**

10.1. Paruošti apytiksliai 10^6 ląstelių, paimtų po 3 dienų auginimo iš atitinkamo teigiamo *C. m.* subsp. *sepedonicus* bandinio tiriamojo izoliato kultūrų ir atitinkamo teigiamo kontrolinio *C. m.* subsp. *sepedonicus* štamo, inokuliatą.

10.2. Inokuliuoti 5–10 baklažanų daigų 3 lapelio stadijoje esančius stiebus (7.3 arba 7.4 skirsnis).

10.3. Inkubuoti 18–24 °C temperatūroje, esant pakankamai šviesos ir palyginti daug drėgmės, tinkamai laistant, stengiantis išvengti permirkimo arba sausros sukeliamo poveikio (7.7 skirsnis). Esant grynoms kultūroms, tipiškas vytimas turėtų įvykti po 2 savaičių, tačiau augalų simptomų nebus stebima (žr. 7.8 skirsnį). Pasibaigus šiam laikotarpiui, augalai dar 3 savaitėms inkubuojami esant baklažanų augimui palankiai temperatūrai, neviršijančiai 25 °C (8 priedėlis). Jei po 3 savaičių simptomai nėra stebimi, *C. m.* subsp. *sepedonicus* kultūros negalima laikyti patogenine.

10.4. Išskirti iš simptominių augalų, nupjaunant stiebo dalį 2 cm virš inokuliavimo vietos. Pašalinta dalis susmulkinama ir suspenduojama nedideliame sterilaus distiliuoto vandens tūryje arba 50 mM fosfatiniame buferiniame tirpale (3 priedėlis). Išskiriama iš suspensijos skiedimo būdu paskleidžiant arba ruožuojant į MTNA ir YPGA terpes (5 priedėlis), 3–5 dienas inkubuojama 21–23 °C temperatūroje ir stebimas *C. m.* subsp. *sepedonicus* tipiškų kolonijų susiformavimas.

▼M1

1 priedėlis

Metodikas optimizuojančios ir patvirtinančios laboratorijos

Laboratorija [1]	Buvimo vieta	Šalis
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Viena ir Lincas	Austrija
Departement Gewasbescherming	Merelbekas	Belgija
Plantedirektoratet	Lingbis	Danija
Central Science Laboratory	Jorkas	Anglija
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburgas	Škotija
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité de Bactériologie	Anžeras	Prancūzija
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Prancūzija
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnovas	Vokietija
Pflanzenschutzamt Hannover	Hanoveris	Vokietija
State Laboratory	Dublinas	Airija
Plantenziektenkundige Dienst	Vageningenas	Nyderlandai
Norwegian Crop Research Institute, Plant Protection Centre	Aas	Norvegija
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lisabona	Portugalija
Nacionalni institut za biologijo	Liubliana	Slovėnija
Centro de Diagnóstico de Aldearrubia	Salamanka	Ispanija

[1] Mokslininkai ryšiams palaikyti: žr. tinklavietę http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

▼M1

2 priedėlis

Pagrindinių atrankos testų PGR/IF ir FISH teigiamų ir neigiamų kontrolinių bandinių paruošimas

C. m. subsp. *sepedonicus* virulentiškas štamas [NCPPB 4053 arba PD 406] 72 valandas auginamas MTNA pagrindinėje terpėje ir suspenduojamas 10 mM fosfatiniame buferiniame tirpale, kad ląstelių tankis siektų apie 1-2 × 10^8 kfv/ml. Paprastai gaunama šiek tiek drumsta suspensija, kurios optinis tankis, matuojamas 600 nm bangų ilgio spektre, yra 0,2.

Stiebagumbių viršūnės gabaliukai išpjaunami iš 200 baltą odelę turinčios veislės stiebagumbių, kurie, kaip žinoma, neužkrėsti *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

Stiebagumbių viršūnės gabaliukai susmulkinami taip, kaip įprasta, o gautos nuosėdos pakartotinai suspenduojamos 10 ml.

Į dešimt sterilių 1,5 ml tūrio miniatiūrinių mėgintuvėlių įpilama po 900 µl pakartotinai suspenduotų nuosėdų.

100 µl *C. m.* subsp. *sepedonicus* suspensijos įpilama į pirmąjį miniatiūrinį mėgintuvėlį. Suplakama.

Penkiuose paskesniuose miniatiūriniuose mėgintuvėliuose atliekami užkrato praskiedimai 1/10.

Šeši miniatiūriniai mėgintuvėliai su užkratu bus naudojami kaip teigiami kontroliniai bandiniai. Keturi miniatiūriniai mėgintuvėliai be užkrato bus neigiami kontroliniai bandiniai. Šie mėgintuvėliai atitinkamai paženklinami.

Į sterilius 1,5 ml tūrio miniatiūrinius mėgintuvėlius įpilama po 100 µl alikvotinių dalių ir gaunama po 9 kiekvieno kontrolinio bandinio pakartojimus, kurie iki panaudojimo yra saugomi –16–24 °C temperatūroje.

Atliekant IF testą, *C. m.* subsp. *sepedonicus* buvimas ir kiekis pirmiausia nustatomi kontroliniuose bandiniuose.

Atliekant kiekvienos serijos tiriamųjų bandinių PGR testą, DNR išskiriama tiek iš teigiamų, tiek iš neigiamų kontrolinių bandinių.

Atliekant kiekvienos serijos tiriamųjų bandinių IF ir FISH testą, tiriami ir teigiami, ir neigiami kontroliniai bandiniai.

Atliekant IF, FISH ir PGR testus, *C. m.* subsp. *sepedonicus* būtina aptikti mažiausiai 10^6 ląstelių ir esant 10^4 ląstelių/ml tankiui tik teigiamuose kontroliniuose bandiniuose, o ne neigiamuose kontroliniuose bandiniuose.

▼M1

3 priedėlis

Buferiniai tirpalai tyrimui

BENDRA PASTABA: Neatidarytose steriliose talpyklose buferinius tirpalus galima saugoti iki vienerių metų.

1. **Buferiniai tirpalai išskyrimui**

1.1. *Ekstrahavimo buferinis tirpalas (50 mM fosfatinis buferinis tirpalas, pH 7,0)*

Šis buferinis tirpalas naudojamas bakterijai išskirti iš augalinės kilmės audinių homogenizacijos arba kratymo būdu.

Na_2HPO_4 (bevandenis)	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
Distiliuotas vanduo	1,00 L

Ištirpinti ingredientus, patikrinti pH ir 15 minučių sterilizuoti autoklave 121 °C temperatūroje.

Galima panaudoti šias papildomas sudedamąsias dalis:

	Naudojimo tikslas	Kiekis 1 litre
Lubrolio dribsnius	Deflokuliantas (*)	0,5 g
DC (tiesioginio stingimo) silicio priešputis	Priešputis (*)	1,0 ml
Tetranatrio pirofosfatas	Antioksidantas	1,0 g
Polivinilpirolidonas-40 000 (PVP-40)	PGR inhibitorių surišėjas	50 g

(*) Naudoti išskiriant homogenizacijos metodu.

1.2. *Nuosėdų buferinis tirpalas (10 mM fosfatinis buferinis tirpalas, pH 7,2)*

Šis buferinis tirpalas naudojamas bulvių stiebagumbių viršūnių gabaliukų ekstraktų pakartotiniam suspendavimui ir praskiedimui baigus nuosėdų koncentravimą centrifuguojant.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,4 g
Distiliuotas vanduo	1,00 l

Ištirpinti ingredientus, patikrinti pH ir 15 minučių sterilizuoti autoklave 121 °C temperatūroje.

2. **Buferiniai tirpalai IF testui**

2.1. *IF-buferinis tirpalas (10 mM fosfatinis buferinis druskos tirpalas (PBS), pH 7,2)*

Šis buferinis tirpalas naudojamas antikūnų praskiedimams atlikti.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,4 g
NaCl	8,0 g
Distiliuotas vanduo	1,0 l

Ištirpinti ingredientus, patikrinti pH ir 15 minučių sterilizuoti autoklave 121 °C temperatūroje.

2.2. *IF-buferinis tirpalas, turintis Tween*

Šis buferinis tirpalas naudojamas plokštelėms plauti.

Į IF buferinį tirpalą įpilti 0,1 % Tween-20.

2.3. *Fosfatinis buferinis glicerino tirpalas, pH 7,6*

Šis buferinis tirpalas naudojamas kaip sukibimo skystis IF plokštelių langeliuose fluorescencijai sustiprinti.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	3,2 g

▼**M1**

$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,15 g
Glicerinas	50 ml
Distiliuotas vanduo	100 ml

Priešblukinančiu aktyvumu pasižyminčius sukibimą skatinančius tirpalus galima įsigyti prekyboje, pvz., komercinį tirpalą *Vectashield® (Vector Laboratories)* arba *Citifluor® (Leica)*.

▼**M1**

4 priedėlis

Užkrėtimo laipsnio nustatymas IF ir FISH testais

1. Nustatyti tipiškų fluorescuojančių ląstelių skaičiaus viename matymo laukelyje vidurkį (c).
2. Nustatyti tipiškų fluorescuojančių ląstelių viename mikroskopu stebimos plokštelės langelyje skaičių (C).

   $C = c \times S/s$,

   čia S = daug langelių turinčios plokštelės langelio paviršiaus plotas, ir

   s = objektyvo laukelio paviršiaus plotas.

   $s = \pi i^2/4G^2K^2$, čia i = lauko koeficientas (kinta nuo 8 iki 24 priklausomai nuo okuliaro tipo),

   K = vamzdelio koeficientas (1 arba 1,25),

   G = objektyvo padidinimas (100 kartų, 40 kartų ir pan.).

3. Nustatyti tipiškų fluorescuojančių ląstelių pakartotinai suspenduotų nuosėdų viename mililitre skaičių (N).

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

   čia y = pakartotinai suspenduotų nuosėdų tūris kiekviename langelyje, ir

   F = pakartotinai suspenduotų nuosėdų praskiedimo faktorius.

▼**M1**

5 priedėlis

C. m. **subsp.** *sepedonicus* **išskyrimo ir auginimo terpė**

a) *Pagrindinė auginimo terpė*

Mitybinis agaras (MA)

Mitybinis agaras (Difco)	23,0 g
Distiliuotas vanduo	1,0 l

Ingredientus ištirpinti ir 15 minučių sterilizuoti autoklave 121 °C temperatūroje.

Mitybinis dekstrozės agaras (MDA)

Difco bakterijų mitybinis agaras, turintis 1 % D(+) gliukozės (monohidrato). 20 minučių sterilizuoti autoklave 115 °C temperatūroje.

Mielių peptono gliukozės agaras (MPGA)

Mielių ekstraktas (Difco)	5,0 g
Baktopeptonas (Difco)	5,0 g
D(+) gliukozė (monohidratas)	10,0 g
Baktoagaras (Difco)	15,0 g
Distiliuotas vanduo	1,0 l

Ingredientus ištirpinti ir 15 minučių sterilizuoti autoklave 121 °C temperatūroje.

Mielių ekstrakto mineralinių druskų terpė (MGT)

Bacto – mielių ekstraktas (Difco)	2,0 g
D(+) Gliukozė (monohidratas)	2,5 g
K_2HPO_4	0,25 g
KH_2PO_4	0,25 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,1 g
$MnSO_4.\ H_2O$	0,015 g
NaCl	0,05 g
$FeSO_4.7H_2O$	0,005 g
Baktoagaras (Difco)	18 g
Distiliuotas vanduo	1,0 l

Ingredientus ištirpinti 0,5 l terpės ir 20 minučių sterilizuoti autoklave 115 °C temperatūroje.

b) *Patvirtintos selektyvios auginimo terpės*

MTNA terpė

Visi terpės komponentai gauti iš bendrovės „BDH”, nebent nurodyta kitaip:

Mielių ekstraktas (Difco)	2,0 g
Manitolis	2,5 g
K_2HPO_4	0,25 g
KH_2PO_4	0,25 g
NaCl	0,05 g
$MgSO_4.7\ H_2O$	0,1 g
$MnSO_4.\ H_2O$	0,015 g
$FeSO_4.7H_2O$	0,005 g
Oxoid (Nr. 1) agaras	16,0 g
Distiliuotas vanduo	1,0 l

▼**M1**

Ištirpinti ingredientus, nustatyti pH 7,2. Baigus sterilizavimą autoklave (15 minučių 121 °C temperatūroje) ir atvėsinus iki 50 °C temperatūros, pridedama antibiotikų: trimetoprimo -0,06 g, nalidiksilo rūgšties -0,002 g ir amfotericino B -0,01 g.

Antibiotikų pradiniai tirpalai: trimetoprimą (Sigma) ir nalidiksilo rūgštį (Sigma) (abiejų koncentracijai esant 5 mg/ml) ištirpinti 96 % metanolio tirpale, amfotericiną B (Sigma) (1 mg/ml) – dimetilsulfoksido tirpale. Pradiniai tirpalai sterilizuojami filtruojant.

Pastaba:

Pagrindinės terpės galiojimo laikas -3 mėnesiai. Pridėjus antibiotikų, terpės galiojimo laikas yra vienas mėnuo, jei laikoma šaltai.

NCP-88 terpė

Mitybinis agaras (Difco)	23 g
Mielių ekstraktas (Difco)	2 g
D-manitolis	5 g
K_2HPO_4	2 g
KH_2PO_4	0,5 g
$MgSO_4.7\ H_2O$	0,25 g
Distiliuotas vanduo	1,0 l

Ištirpinti ingredientus, nustatyti pH 7,2. Baigus sterilizavimą autoklave ir atvėsinus iki 50 °C temperatūros pridedama antibiotikų: polimiksino B sulfato (Sigma) - 0,003 g, nalidiksilo rūgšties (Sigma) - 0,008 g ir cikloheksimido (Sigma) - 0,2 g.

Antibiotikai ištirpinami pradiniuose tirpaluose: nalidiksilo rūgštis -0,01 M NaOH, cikloheksimidas -50 % etanolyje ir polimiksinas B - distiliuotame vandenyje. Pradiniai tirpalai sterilizuojami filtruojant.

Pastaba:

Pagrindinės terpės galiojimo laikas -3 mėnesiai. Pridėjus antibiotikų, terpės galiojimo laikas yra vienas mėnuo, jei laikoma šaltai.

▼M1

6 priedėlis

Patvirtinta PGR metodika ir reagentai

Pastaba:

Atliekant išankstinį testą viename bandinio ekstrakto mililitre turėtų būti pakartotinai aptinkama mažiausiai 10^3-10^4 *C. m. sepedonicus* ląstelių.

Atliekant išankstinį tyrimą, auginant pasirinktą bakterijų štamų rinkinį taip pat neturėtų būti gaunama netikrųjų teigiamų rezultatų.

1. **Daugkartinės PGR naudojant vidinį PGR kontrolinį bandinį metodika (Pastrik, 2000)**

1.1. *Oligonukleotidiniai pradmenys*

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

C. m. subsp. *sepedonicus* matricinės DNR numatomos padauginti kopijos dydis - apie 502 bp (PSA-pradmenų rinkinys).

Vidinio kontrolinio bandinio 18S rRNA numatomas padaugintos matricinės DNR kopijos dydis -377 bp (NS-pradmenų rinkinys).

1.2. *PGR reakcinis mišinys*

Reagentas	Reakcinis kiekis	Galutinė koncentracija
Sterilus YGV (ypač grynas vanduo)	15,725µl	
10 × koncentruotas PGR buferinis tirpalas ([1]) (15 mM $MgCl_2$)	2,5 µl	1x (1,5 mM $MgCl_2$)
GSA (V frakcija) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
d-nTP mišinys (20mM)	0,125 µl	0,1 mM
PSA-1 pradmuo (10µM)	0,5 µl	0,2 µM
PSA-R pradmuo (10µM)	0,5 µl	0,2 µM
NS-7-F pradmuo (10µM) ([2])	0,1 µl	0,04 µM
NS-8-R pradmuo (10µM) ([2])	0,1 µl	0,04 µM
Taq polimerazė (5U/µl) ([1])	0,2 µl	1,0 U
Bandinio tūris	5,0 µl	
Bendras tūris	25,0 µl	

([1]) Metodai patvirtinti naudojant *Taq* polimerazę, gautą iš bendrovės „Perkin Elmer" (*AmpliTaq* arba *Gold*) ir bendrovės „Gibco BRL".

([2]) Pradmenų NS-7 F ir NS-8-R koncentracijos buvo optimizuotos atsižvelgiant į bulvių stiebagumbių viršūnių kūgio formos gabaliukų išskyrimą homogenizacijos ir DNR gryninimo metodu pagal Pastriką (2000) (žr. 6.1.a ir 6.2 skirsnius). Pakartotinė reagentų koncentracijų optimizacija bus reikalinga, jei taikomas išskyrimo kratymo būdu metodas arba kiti DNR metodai.

1.3. *PGR reakcijos sąlygos*

Reakciją vykdyti pagal šią programą:

1 ciklas:	i)	3 minutės 95 °C temperatūroje (matricinės DNR denatūracija);
10 ciklų:	ii)	1 minutė 95 °C temperatūroje (matricinės DNR denatūracija);
	iii)	1 minutė 64 °C temperatūroje (pradmenų surišimas);
	iv)	1 minutė 72 °C temperatūroje (matricinės DNR kopijos ilginimas);
25 ciklai:	v)	30 sekundžių 95 °C temperatūroje (matricinės DNR denatūracija);

▼M1

	vi)	30 sekundžių 62 °C temperatūroje (pradmenų surišimas);
	vii)	1 minutė 72 °C temperatūroje (matricinės DNR kopijos ilginimas);
1 ciklas:	viii)	5 minutės 72 °C temperatūroje (galutinis ilginimas);
	ix)	saugoti 4 °C temperatūroje.

Pastaba:

Ši programa optimizuota naudojant bendrovėje „MJ Research PTC 200" pagamintą šiluminį PGR reaktorių. Ciklų (ii), (iii) (iv), (v), (vi) ir (vii) etapus galima modifikuoti naudojant kitų modelių šiluminius PGR reaktorius.

1.4. *Padaugintos matricinės DNR restrikcijos fermentų analizė*

Padauginus *C. m.* subsp. *sepedonicus* DNA, gauti PGR produktai buvo veikiami restriktaze *Bgl* II, 30 minučių inkubuojant 37 °C temperatūroje, ir buvo stebimas skirtingo ilgio restrikcinio fragmento polimorfizmas. Restrikcinių fragmentų, gautų iš *C. m.* subsp. *sepedonicus* būdingo fragmento, ilgis yra 282 bp ir 220 bp.

2. **Užpildo buferinio tirpalo paruošimas**

2.1. *Bromfenolio mėlynasis (10 % pradinis tirpalas)*

Bromfenolio mėlynasis	5 g
Distiliuotas vanduo (perdistiliuotas)	50 ml

2.2. *Užpildo buferinis tirpalas*

Glicerinas (86 %)	3,5 ml
Bromfenolio mėlynasis (5,1)	300 µl
Distiliuotas vanduo (perdistiliuotas)	6,2 ml

3. **10X Tris acetato EDTA (TAE) buferinis tirpalas, pH 8,0**

Tris buferinis tirpalas	48,4 g
Acto ledinė rūgštis	11,42 ml
EDTA (dinatrio druska)	3,72 g
Distiliuotas vanduo	1,00 l

Praskiesti 1 kartą prieš naudojimą.

Visi reagentai įsigyjami prekyboje (iš bendrovės „Invitrogen" ar panašios bendrovės).

▼M1

7 priedėlis

FISH testui patvirtinti reagentai

1. **Oligo-bandiniai**

Cms-specifinis bandinys CMS-CY3-01	5'- ttg cgg ggc gca cat ctc tgc acg -3'
Nespecifinis eubakterijų bandinys EUB-338-FITC	5'- gct gcc tcc cgt agg agt-3'

2. **Fiksavimo tirpalas**

(DĖMESIO! FIKSAVIMO TIRPALE YRA TOKSIŠKO PARAFORMALDEHIDO. DIRBDAMI MŪVĖKITE PIRŠTINES IR NEĮ KVĖPKITE. REKOMENDUOJAMA DIRBTI TRAUKOS SPINTOJE)

i) 9 ml molekulinės biologijos darbams skirto vandens (pvz., ypač gryno vandens (YGV)) pakaitinti 60 °C temperatūroje ir pridėti 0,4 g paraformaldehido. Paraformaldehidas ištirpsta įdėjus 5 lašus 1N NaOH ir maišant magnetine maišykle.

ii) Nustatomas pH 7,0, įdėjus 1ml 0,1 M fosfatinio buferinio tirpalo (FB; pH 7,0) ir 5 lašus 1N HCl. Indikatorinėmis juostelėmis patikrinti pH ir nustatyti pH, jei reikia, įdedant HCl arba NaOH.

(DĖMESIO! PH MATAVIMO PRIETAISO NENAUDOTI TIRPALUOSE SU PARAFORMALDEHIDU)

iii) Tirpalą filtruoti 0,22 µm membraniniu filtru ir, kol bus toliau naudojamas, nuo dulkių saugoti 4 °C temperatūroje.

iv) *Pastaba:*

Alternatyvus fiksuojamasis tirpalas: 96 % etanolis.

3. **3X Hybmix tirpalas**

NaCl	2,7 M
Tris-HCl	60 mM (pH 7,4)
EDTA (filtruotas steriliu filtru ir sterilizuotas autoklave)	15 mM

Praskiesti 1 kartą, kaip reikalaujama.

4. **Hibridizavimo tirpalas**

1 kartą koncentruotas Hybmix

Natrio dodecilsulfatas (SDS)	0,01 %
bandinys EUB 338	5 ng/µl
bandinys CMSCY301	5 ng/µl

Paruošti hibridizavimo mišinio kiekius pagal 1 lentelėje pateikiamus apskaičiavimus. Kiekvienai plokštelei (į kurios langelius įpilama po 2 skirtingus bandinius ir jų kartotinius) reikia 90 µl hibridizavimo tirpalo.

Lentelė. Siūlomi kiekiai hibridizavimo mišiniui paruošti

	2 plokštelės	8 plokštelės
Sterilus YGV	50,1	200,4
3x hybmix	30,0	120,0
1 % SDS	0,9	3,6
Bandinys EUB 338 (100 ng/µl)	4,5	18,0
Bandinys CMSCY301 (100 ng/µl)	4,5	18,0
Bendras tūris (µl)	90,0	360,0

Pastaba: Visus tirpalus, turinčius šviesai jautrių oligonukleotidinių bandinių, saugoti tamsoje -20 °C temperatūroje. Naudojimo metu saugoti nuo tiesioginės saulės arba elektros šviesos.

5. **0,1 M Fosfatinis buferinis tirpalas, pH 7,0**

Na_2HPO_4	8,52 g

▼**M1**

KH_2PO_4	5,44 g
Distiliuotas vanduo	1,00 l

Ingredientai ištirpinami, patikrinamas pH, ir tirpalas 15 minučių sterilizuojamas autoklave 121 °C temperatūroje.

▼**M1**

8 priedėlis

Baklažano kultūra

Baklažano (*Solanum melongena*) sėklos pasodinamos pasterizuotame sėklų komposte. Daigai su visiškai išsiskleidusiomis sėklaskiltėmis (10–14 dienų) persodinami į vazonėlį su pasterizuotu kompostu.

Baklažanai turi būti auginami šiltnamyje esant tokioms aplinkos sąlygoms:

dienos ilgumas		14 valandų arba natūralus dienos ilgumas, jeigu diena ilgesnė;
temperatūra	dieną	21–24 °C,
	naktį	15 °C.
Jautrios baklažanų veislės:		„Black Beauty”,
		„Long Tom”,
		„Rima”,
		„Balsas”.

Tiekėjas: žr. tinklavietę http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

▼M1

9 priedėlis

Dažymas Gramo Būdu (Hukerio Modifikacija) (Doetsch, 1 981 m.) ([1])

Kristalvioleto tirpalas

2 g kristalvioleto ištirpinama 20 ml 95 % etanolio.

0,8 g amonio oksalato ištirpinama 80 ml distiliuoto vandens.

Šie du tirpalai sumaišomi.

Liugolio jodas

Jodas	1 g
Kalio jodidas	2 g
Distiliuotas vanduo	300 ml

Kietosios medžiagos kartu sutrinamos grūstuve. Supilama į vandenį ir uždarame inde išmaišoma, kad ištirptų.

Safranino kontradažymo tirpalas

Pradinis tirpalas:

Safraninas O	2,5 g
95 % etanolis	100 ml

Sumaišoma ir laikoma.

Praskiedžiama: 1:10 norint gauti darbinį tirpalą.

Dažymo tvarka

1. Paruošti tepinėliai išdžiovinami ore, vėliau kaitinant fiksuojami.
2. Plokštelė vienai minutei pamerkiama į kristalvioleto tirpalą.
3. Perliejama vandeniu iš čiaupo.
4. Vienai minutei pamerkiama į liugolio jodą.
5. Perliejama vandeniu iš čiaupo ir nusausinama sugeriamuoju popieriumi.
6. Išblukinama lašinant 95 % etanolį, kol spalva nebebluks, arba atsargiai maišant pamerkiama 30 sekundžių.
7. Nuplaunama vandeniu iš čiaupo ir nusausinama sugeriamuoju popieriumi.
8. 10 sekundžių pamerkiama į safranino tirpalą.
9. Nuplaunama vandeniu iš čiaupo ir sausai išdžiovinama.

Gram (+) bakterijos nusidažo violetine mėlyna spalva; Gram (-) bakterijos nusidažo rausvai raudona spalva.

NUORODOS

1. Anonymous, 1987. Scheme of the detection and diagnosis of the ring rot bacterium *Corynebacteriun sepedonicum* in batches of potatoe tubers. Commission of the European Communities, Luxembourg. Publ EUR 11 288 EN, 21 pp.
2. Bradbury, J. F., 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. Rev. Pl. Path., 49, 213–218.
3. Dinesen, I. G., 1984. The extraction and diagnosis of *Corynebacterium sepedonicum* from diseased potato tubers. EPPO Bull. 14 (2), 147–152.
4. Doetsch, R. N., 1981. Determinative methods of light microscopy. In: Manual of methods for general bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, 21-23.
5. Hugh, R. and Leifson, F., 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. J. Bact., 66, 24–26.
6. Janse, J. D., 1991. Infra- and intra-specific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty-acid analysis. Systematic and Applied Microbiology 14; 335–345.

([1]) Galima naudoti ir parduodamus tirpalus bei dažymo reikmenis.

▼M1

7. Janse, J. D. and J. Van Vaerenbergh. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (*Corynebacterium sepedonicum*) in potato. EPPO Bull., No 17, 1987, pp. 1–10.

8. Jansing, H. and K. Rudolph, 1998. Physiological capabilities of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* and development of a semi-selective medium. Journal of Plant Diseases and Protection, 105, 590–601.

9. Kovacs, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature, Lond., 178, 703.

10. Klement Z.; Rudolph, K and D. C. Sands, 1990. Methods in Phytobacteriology. Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 pp.

11. Lelliott, R. A., 1966. The plant pathogenic coryneform bacteria. J. appl. Bact., 29, 114–118.

12. Lelliott, R. A., E. Billing and A. C. Hayward, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads J. appl. Bact., 29, 470–489.

13. Lelliott, R. A. and P. W., Sellar, 1976. The detection of latent ring rot (*Corynebacterium sepedonicum* (Spiek. et Kotth.) Skapt. et Burkh.) in potato stocks. EPPO Bull., 6 (2), 101–106.

14. Li, X. and S.H. de Boer, 1995. Selection of Polymerase Chain Reaction primers from RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Phytopathology, 85, 837–842.

15. Mills, D., Russell, B., W. and J., W. Hanus, 1997. Specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* by amplification of three unique DNA sequences isolated by subtraction hybridization. Phytopathology, 87, 8, 853–861.

16. Pastrik, K. -H. and R.A. Rainey. 1999. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. J. Phytopathology 147; 687–693.

17. Pastrik, K.-H., 2000. Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. European Journal of Plant Pathology, 106, 155–165.

18. Ramamurthi, C. S., 1959. Comparative studies on some Gram-positive phytopathogenic bacteria and their relationship to the Corynebacteria. Mem. Cornell agric. Exp. Sta., 366, 52 pp.

19. Schaad, W., Berthier-Schaad, Y., Sechler, A. and Knorr, D. (1999) Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system. Plant Disease 83; 1095–1100.

20. Schaad, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Schaad [Hrsg.]. – 3. ed.; St. Paul, Minnesota:, 373 pp.

21. Skerman, V. B. D., 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria. 2nd ed., William and Wilkins Company, Baltimore.

22. Smith, N. C.; Hennesy, J; Stead, D.E., 2001. Repetittive sequence-derived PCR profiling using the BOX-A1*Ralstonia solanacearum* primer for rapid identification of plant pathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. European Journal of Plant Pathology, 107 (7), 739–748.

23. Sneath, P. H. A. and V. G. Collins, 1974. A study in test reproductibility between laboratories: report of Pseudomonas working party. Antonie van Leeuwenhoek, 40, 481–527.

24. Stead, D.E. 1992. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty-acid profiles. International Journal of Systematic Bacteriology 42; 281–295.

25. Wullings, B. A.; van Beuningen, A. R.; Janse, J. D. and A. D. L. Akkermans, 1998. Detection of *Ralstonia solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent *in situ* hybridization with 23s rRNA-targeted probes. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4546–4554.

▼**M1**

II PRIEDAS

1. Kiekvienu įtariamu organizmo buvimo atveju, kai taikant I priede išdėstytus metodus buvo gautas teigiamas atrankos testo rezultatas, ir baigus šį tyrimą yra laukiama patvirtinimo arba paneigimo, reikia atskirti ir tinkamai užkonservuoti:

   — visus atrinktus bandiniams stiebagumbius ir, jei įmanoma, visus atrinktus augalus,

   — bet kurį likusį ekstraktą ir atrankos testui paruoštą papildomą medžiagą, pvz., imunofluorescencines skaidres,

   ir

   — visus atitinkamus dokumentus,

   kol tyrimas taikant minėtus metodus bus baigtas.

   Atskyrus stiebagumbius, tam tikrais atvejais bus galima ištirti įvairias veisles.

2. Jeigu organizmo buvimas patvirtinamas, reikia atskirti ir tinkamai užkonservuoti:

   — visą medžiagą, minėtą 1 dalyje,

   ir

   — užkrėstos baklažanų medžiagos bandinį, kuris buvo inokuliuotas stiebagumbio arba augalo ekstraktu,

   ir

   — išskirtą organizmo kultūrą,

   mažiausiai per vieną mėnesį nuo pranešimo 5 straipsnio 2 dalyje nurodyta tvarka.

▼**M1**

III PRIEDAS

1. Nustatant galimo užkrėtimo mastą pagal 5 straipsnio 1 dalies b punktą, reikia atsižvelgti į:

   — stiebagumbius ir augalus, auginamus produkcijos gamybos vietoje, kuri laikoma užkrėsta pagal 5 straipsnio 1 dalies a punktą,

   — produkcijos gamybos vietą (-as), kuri susijusi su stiebagumbiais ar augalais, laikomais užkrėstais pagal 5 straipsnio 1 dalies a punktą, įskaitant tas, kur tiesiogiai arba tiekėjui tarpininkaujant per tą patį tiekėją yra dalijamasi gamybos įranga ir priemonėmis,

   — stiebagumbius arba augalus, esančius produkcijos gamybos vietoje(-ose), kuri(-ios) minima(-os) ankstesnėje įtraukoje, arba esančius tokioje(-iose) gamybos vietoje(-ose), tuo laikotarpiu, kai stiebagumbiai ir augalai, laikomi užkrėstais pagal 5 straipsnio 1 dalies a punktą, buvo produkcijos gamybos vietoje, kuri minima pirmojoje įtraukoje,

   — patalpas, kuriose laikomos bulvės, užaugintos produkcijos gamybos vietose, nurodytose ankstesnėse įtraukose,

   — bet kokią techniką, transporto priemonę, laivą, saugyklą arba jų dalis ir visus kitus atitinkamus objektus, įskaitant pakuotę, kurie galėjo turėti sąlytį su stiebagumbiais arba augalais, laikomais užkrėstais pagal 5 straipsnio 1 dalies a punktą,

   — bet kokius stiebagumbius arba augalus, laikomus arba turėjusius sąlytį su bet kokiomis struktūromis ar objektais, minėtais ankstesnėje įtraukoje, iki tokių struktūrų ar objektų išvalymo ir dezinfekavimo,

   — taip pat, atlikus tyrimą pagal 6 straipsnį, stiebagumbius arba augalus, susijusius motininiais ar seseriniais klonavimo ryšiais su stiebagumbiais arba augalais, kurie laikomi užkrėstais pagal 5 straipsnio 1 dalies a punktą, ir kurie, kaip buvo nustatyta, neužkrėsti organizmu, tačiau užkrėtimo galimybė dėl klonavimo kilmės yra didelė. Galima tirti veislę užkrėstų ir klonavimu susijusių stiebagumbių ar augalų identitetui nustatyti,

   — stiebagumbių ar augalų, nurodytų ankstesnėje įtraukoje, produkcijos gamybos vietą (-as).

2. Nustatant galimą išplitimą pagal 5 straipsnio 1 dalies c punktą reikia atsižvelgti į:

   — arti esančias kitas produkcijos gamybos vietas, kuriose auginamos bulvės arba kiti augalai šeimininkai,

   — bendro gamybos proceso metu gautų ir naudotų sėklinių bulvių atsargas.

3. Pagal 5 straipsnio 2 dalies pirmąją pastraipą informuojama:

   — nedelsiant, nustačius organizmą laboratorijoje I priede išdėstytais metodais, nurodant bent:

      — bulvių siuntos veislės pavadinimą,

      — bulvių tipą (maistinės, sėklinės ir pan.) ir tam tikrais atvejais – sėklinių bulvių kategoriją,

   — kai yra pavojus, kad iš kitos (-ų) valstybės (-ių) narės (-ių) ar į jas pateks užkrėstos bulvės, valstybė narė, kurioje toks atvejis buvo patvirtintas, nedelsdama pateikia suinteresuotai (-oms) valstybei (-ėms) narei (-ėms) informaciją, būtiną, kad būtų laikomasi 5 straipsnio 3 dalies nuostatų, nurodydama:

      — bulvių siuntos veislės pavadinimą,

      — krovinio siuntėjo ir krovinio gavėjo pavadinimą ir adresą,

      — bulvių siuntos pristatymo dieną,

      — pristatytos bulvių siuntos dydį,

      — augalo paso kopiją arba tam tikrais atvejais – bent augalo paso numerį arba tam tikrais atvejais – augintojo arba prekiautojo registravimo numerį bei pranešimo apie pristatymą kopiją.

   Pateikus šią informaciją, apie tai yra nedelsiant pranešama Komisijai.

   — Baigus visus tyrimus, visuomet yra pateikiama:

      — užkrėtimo patvirtinimo diena,

      — tyrimo, atlikto užkrėtimo šaltiniui ir galimam plitimui nustatyti, įskaitant bandinių ėmimo lygį, trumpas aprašymas,

      — informacija apie identifikuotą (-us) arba tariamą (-us) užkrėtimo šaltinį (-ius),

      — duomenys apie nustatyto užkrėtimo mastą, įskaitant produkcijos gamybos vietų skaičių ir siuntų skaičių, nurodant veislę ir, jei sėklinės bulvės, kategoriją,

▼**M1**

— duomenys apie teritorijos demarkavimą, įskaitant produkcijos vietų, kurios nelaikomos užkrėstomis, bet esančios toje teritorijoje, skaičių,

— Komisijai pareikalavus – bet kokią kitą informaciją apie patvirtintą protrūkį.

▼**M1**

IV PRIEDAS

1. Oficialiai prižiūrimos priemonės, minimos 7 straipsnio 1 dalyje, yra tokios:

— panaudojimas gyvūnų pašarui po terminio apdorojimo, užtikrinant, kad nėra organizmo išlikimo pavojaus,

arba

— pašalinimas oficialiai tam tikslui patvirtintoje atliekų šalinimo vietoje, kurioje nėra nustatyto pavojaus, kad patogenai pateks į aplinką, pvz., nutekės į dirbamą žemės plotą,

arba

— sudeginimas,

arba

— panaudojimas pramoniniam perdirbimui tiesiai ir skubiai pristatant į perdirbimo cechą, kuriame yra oficialiai patvirtinti atliekų šalinimo įrenginiai, nustačius, kad nėra organizmo išplitimo pavojaus ir kur yra bent išvykstančių transporto priemonių valymo ir dezinfekavimo sistema,

arba

— kitos priemonės, jeigu užtikrinama, kad nėra organizmo išplitimo pavojaus; apie tokias priemones ir jų patvirtinimą turi būti pranešta Komisijai ir kitoms valstybėms narėms.

Visos likusios atliekos, susijusios su pirmiau nurodytais atliekų šalinimo procesais, arba atsiradusios jų metu, yra pašalinamos oficialiai patvirtintais metodais pagal šios direktyvos V priedo nuostatas.

2. Tinkamos stiebagumbių arba augalų, laikomų galbūt užkrėstais pagal 5 straipsnio 1 dalies b punktą, kaip minėta 7 straipsnio 2 dalyje, panaudojimo ar sunaikinimo priemonės, taikomos kontoliuojant valstybės narės atsakingoms oficialioms institucijoms ir joms atitinkamai bendradarbiaujant, kai siekiama visada užtikrinti tokią kontrolę ir patvirtinimą, atliktą valstybės narės atsakingų oficialių institucijų, kad bulvės yra pakuojamos ar perdirbamos tose įmonėse, kuriose yra pirmojoje ir antrojoje įtraukose minimi atliekų šalinimo įrenginiai, yra šios:

— naudojimas kaip maistinių bulvių, skirtų žmonėms vartoti, supakuotų tiesioginiam pristatymui ir naudojimas neperpakuojant vietoje, kurioje naudojami atitinkami atliekų šalinimo įrenginiai. Bulvės, skirtos sodinti gali būti tvarkomos toje pačioje vietoje, jei tai atliekama atskirai, ar baigus valymą ir dezinfekavimą,

arba

— naudojimas kaip maistinių bulvių, skirtų pramoniniam perdirbimui ir tiesioginiam ir neatidėliotinam pristatymui į perdirbimo įmonę, kurioje yra tinkami atliekų šalinimo įrenginiai arba yra naudojama bent išvykstančių transporto priemonių valymo ir dezinfekavimo sistema,

arba

— kitas panaudojimas ar šalinimas, nustačius, kad nėra organizmo išplitimo pavojaus ir patvirtinus minėtoms atsakingoms oficialioms institucijoms.

3. Tinkamais objektų, minimų 7 straipsnio 3 dalyje, valymo ir dezinfekavimo metodais laikomi tie, kurie neleidžia organizmui išplisti ir yra taikomi prižiūrint atsakingoms oficialioms valstybių narių institucijoms.

4. Priemonės, kurias valstybės narės įgyvendina demarkuotoje teritorijoje, nustatytoje pagal 5 straipsnio 1 dalies c punktą ir minimoje 7 straipsnio 4 dalyje, yra šios:

4.1. produkcijos gamybos vietose, kurios laikomos užkrėstomis pagal 5 straipsnio 1 dalies a punktą:

a) lauke, kuris laikomas užkrėstu pagal 5 straipsnio 1 dalies a punktą:

i) — mažiausiai trejus auginimo metus, einančius po tų, kuriais buvo nustatytas užkrėtimas,

— yra imamasi priemonių, stengiantis išnaikinti savaime augančius bulvių augalus ir kitus natūraliai aptiktus organizmo šeimininkus,

ir

▼M1

— jokie stiebagumbiai, augalai, tikrosios sėklos ar kiti natūraliai aptinkami augalai šeimininkai ar kitos kultūros, keliančios organizmo išplitimo pavojų, negali būti sodinami,

— pirmąjį bulvių auginimo sezoną, einantį po ankstesnėje įtraukoje apibūdinto laikotarpio, ir laikantis sąlygos, kad bent dvejus pastaruosius metus iki sodinimo patikrinimo metu lauke nebuvo rasta savaime sudygstančių bulvių augalų ar kitų natūraliai augančių organizmo šeimininkų, leidžiama auginti tik maistines bulves ir surinktas stiebagumbių derlius tiriamas I priede nurodyta tvarka;

— bulvių auginimo sezoną, einantį po ankstesnėje įtraukoje minimo sezono, ir pasibaigus atitinkamam sėjomainos ciklui, kuris tęsiasi mažiausiai du metus, jei ketinama auginti sėklines bulves, gali būti auginamos sėklinės arba maistinės bulvės, taip pat atliekamas oficialus tyrimas, kaip apibūdinta 2 straipsnio 1 dalyje; arba

ii) — ketverius auginimo metus po tų, kuriais buvo nustatytas užkrėtimas,

— yra imamasi priemonių, stengiantis išnaikinti savaime sudygstančius bulvių augalus ir kitus natūraliai aptiktus organizmo šeimininkus,

— laukas paliekamas pūdymui arba daugiametei ganyklai, kuri dažnai visiškai nupjaunama arba kurioje yra intensyviai ganoma,

— pirmąjį bulvių auginimo sezoną, einantį po ankstesnėje įtraukoje apibūdinto laikotarpio, ir laikantis sąlygos, kad bent dvejus pastaruosius metus iki sodinimo patikrinimo metu lauke nebuvo rasta savaime sudygstančių bulvių augalų ar kitų natūraliai augančių organizmo šeimininkų, leidžiama auginti sėklines ar maistines bulves, ir surinktas stiebagumbių derlius tiriamas I priede nurodyta tvarka;

b) kituose užkrėstuose laukuose laikantis sąlygos, kad atsakingos oficialios institucijos patvirtina, jog yra pašalintas natūraliai sudygstančių bulvių augalų arba kitų natūraliai aptinkamų organizmo šeimininkų keliamas pavojus:

— auginimo metais, einančiais po tų metų, kuriais buvo nustatytas užkrėtimas, jokie stiebagumbiai, augalai, tikrosios sėklos ar kiti natūraliai aptinkami augalai šeimininkai negali būti sodinami, arba

— sertifikuotos sėklinės bulvės gali būti sodinamos tiktai maistui,

— antrais auginimo metais po tų metų, kuriais buvo nustatytas užkrėtimas, tik sertifikuotos sėklinės bulvės ar sėklines bulves, kurias oficialiai patikrinus žiedinio puvinio nebuvo rasta ir kurios auginamos produkcijos gamybos vietose, kitose nei nurodytos 4.1 dalyje, yra auginamos sėklai arba maistui,

— bent trečiais auginimo metais po tų metų, kuriais buvo nustatytas užkrėtimas, tik sertifikuotos sėklinės bulvės ar sėklinės bulvės, kurios išaugintos atliekant oficialią kontrolę iš sertifikuotų sėklinių bulvių, yra auginamos sėklai arba maistui,

— kiekvienais auginimo metais, nurodytais pirmesnėse įtraukose, imamasi priemonių pašalinti savaime sudygstančius bulvių augalus ar kitus natūraliai augančius organizmo šeimininkus, ir bulvių derlius iš kiekvieno lauko yra oficialiai patikrinamas I priede nurodyta tvarka,

c) iškart po to, kai nustatomas užkrėtimas pagal 5 straipsnio 1 dalies a punktą, ir po sekančių auginimo metų, produkcijos gamybos vietose esantys visi mechanizmai ir sandėliavimo įranga, naudojami bulvių gamybos proceso metu, valomi ir dezinfekuojami, kaip nurodyta 3 dalyje;

d) tose gamybos sistemose, kur galima visiškai pakeisti auginimo terpę,

— jokie stiebagumbiai, augalai ar tikrosios sėklos nesodinami, kol produkcijos gamybos vietoje nebus imtasi oficialiai prižiūrimų priemonių, skirtų organizmui išnaikinti ir pašalinti visą augalų šeimininkų medžiagą, įskaitant bent jau auginimo terpės pakeitimą ir produkcijos gamybos vietoje esančių objektų valymą ir dezinfekavimą, ir visos įrangos pakeitimą, o paskui iš atsakingų oficialių institucijų gauti leidimą bulvių produkcijai gaminti,

ir

▼M1

— bulvės auginamos iš sertifikuotų sėklinių bulvių arba iš minigumbų ar mikroaugalų, gautų iš patikrintų šaltinių.

4.2. Nepažeisdamos 4.1 dalyje apibūdintų priemonių, demarkuotoje teritorijoje valstybės narės:

a) nedelsdamos po nustatyto užkrėtimo užtikrina visų mašinų ir saugojimo patalpų, naudojamų bulvių produkcijos gamyboje valymą ir dezinfekciją, kaip numatyta, ir pagal atitinkamus metodus, kaip nurodyta 3 punkte;

b) nedelsdamos ir mažiausiai tris auginimo sezonus po nustatyto užkrėtimo:

— užtikrina, kad jų atsakingos oficialios institucijos prižiūrėtų vietas ir patalpas, kur yra auginami, laikomi ir apdorojami bulvių stiebagumbiai, taip pat patalpas, kur bulvių apdorojimo mašinomis dirbama pagal sutartį,

— reikalauja, kad toje teritorijoje būtų sodinamos tik sertifikuotos sėklinės bulvės arba sėklinės bulvės, išaugintos vykdant oficialią kontrolę ir tiriamos po sėklinių bulvių pasėlių derliaus nuėmimo produkcijos gamybos vietose, laikomomis galbūt užkrėstomis pagal 5 straipsnio 1 dalies b punktą,

— reikalauja, kad būtų atskirai apdorojamas nukastų sėklinių bulvių derlius ir tos maistinės bulvės, kurios buvo laikomos visuose toje teritorijoje esančiuose sandėliuose, arba kad tarp sėklai ir maistui skirtų bulvių atsargų tvarkymo būtų taikoma valymo ir dezinfekavimo sistema,

— atlieka oficialų tyrimą, kaip nustatyta 2 straipsnio 1 dalyje;

c) prireikus per reikiamą laikotarpį parengia visų sėklinių bulvių atsargų pakeitimo programą.

▼M1

V PRIEDAS

Kad būtų išvengta nustatyto organizmo plitimo pavojaus, taikant IV priedo 1 dalyje nurodytus oficialiai patvirtintus atliekų šalinimo metodus yra laikomasi šių sąlygų:

i) bulvių atliekos (įskaitant ir netinkamas bulves bei lupenas) ir kitos kietosios su bulvėmis susijusios atliekos (įskaitant ir dirvožemį, akmenis bei nuolaužas) yra pašalinamos

— oficialiai tam tikslui patvirtintoje atliekų šalinimo vietoje, kurioje nėra nustatyto pavojaus, kad kenksmingasis organizmas pateks į aplinką, pvz., nutekės į dirbamą žemės plotą. Atliekos yra saugiai pristatomos tiesiai į šalinimo vietą, užtikrinant, kad jokia jų dalis nebus išbarstyta,

arba

— jas sudeginant,

arba

— kitomis priemonėmis, jeigu užtikrinama, kad nėra organizmo išplitimo pavojaus. Apie tokias priemones turi būti pranešta Komisijai ir kitoms valstybėms narėms.

ii) skystos atliekos: prieš pašalinant skystas atliekas, savo sudėtyje turinčias kietų dalelių, šios dalelės pašalinamos filtruojant arba nusodinamos. Šios dalelės pašalinamos kaip nurodyta i papunktyje.

Tuomet skystos atliekos:

— prieš pašalinant mažiausiai 30 minučių yra kaitinamos mažiausiai 60 °C temperatūroje, užtikrinant tokią temperatūrą visame jų tūryje,

arba

— yra kitaip pašalinamos, oficialiai tam pritarus ir oficialiai kontroliuojant, kad nebūtų pavojaus atliekoms patekti į dirbamą žemę. Apie atliekų pašalinimo metodo detales yra pranešama kitoms valstybėms narėms ir Komisijai.

Šiame priede pateikti šalinimo būdai taip pat taikomi atliekoms, susidarančioms tvarkant, šalinant ir perdirbant užkrėstų bulvių siuntas.