31993L0085

18.10.1993. SLUŽBENI LIST EUROPSKIH ZAJEDNICA L 259/1

DIREKTIVA VIJEĆA 93/85/EEZ

od 4. listopada 1993.

o suzbijanju prstenaste truleži gomolja krumpira

VIJEĆE EUROPSKIH ZAJEDNICA,

uzimajući u obzir Ugovor o osnivanju Europske ekonomske zajednice, a posebno njegov članak 43.,

uzimajući u obzir prijedlog Komisije ([1]),

uzimajući u obzir mišljenje Europskog parlamenta ([2]),

uzimajući u obzir mišljenje Gospodarskog i socijalnog odbora ([3]),

budući da proizvodnja krumpira zauzima važno mjesto u poljoprivredi Zajednice; budući da prinos krumpira neprestano ugrožavaju štetni organizmi;

budući da je potrebno putem zaštite uzgoja krumpira protiv takvih štetnih organizama ne samo održati proizvodni kapacitet, već i povećati poljoprivrednu produktivnost;

budući da bi zaštitne mjere za sprečavanje uvođenja štetnih organizama na državno područje države članice imale samo ograničen učinak da takvi organizmi nisu istodobno i metodički pod kontrolom diljem Zajednice i da nije spriječeno njihovo širenje;

budući da je jedan od štetnih organizama na krumpiru *Clavibacter michiganensis (Smith) Davis et al.* ssp. *sepedonicus (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al.*, patogeni uzročnik bolesti prstenaste truleži gomolja krumpira; budući da se ta bolest pojavila u nekim dijelovima Zajednice i neki ograničeni izvori zaraze još uvijek postoje;

budući da postoji znatan rizik za uzgoj krumpira u čitavoj Zajednici ako se ne poduzmu učinkovite mjere za lociranje te bolesti i utvrđivanje njezine distribucije kako bi se spriječila njezina pojava i širenje i, ako se pronađe, kako bi se spriječilo njezino širenje te kako bi bila pod nadzorom s ciljem njezina iskorjenjivanja;

budući da se, kako bi se to osiguralo, moraju poduzeti određene mjere unutar Zajednice; budući da države članice moraju povrh toga imati mogućnost poduzeti dodatne ili strože mjere gdje je to potrebno, pod uvjetom da nema zapreka kretanju krumpira unutar Zajednice, osim u onoj mjeri u kojoj je to utvrđeno u Direktivi Vijeća 77/93/EEZ od 21. prosinca 1976. o zaštitnim mjerama protiv unošenja u države članice organizama štetnih za bilje ili biljne proizvode ([4]); budući da se o takvim mjerama moraju obavijestiti druge države članice i Komisija;

budući da je Direktiva Vijeća 80/665/EEZ od 24. lipnja 1980. o suzbijanju prstenaste truleži gomolja krumpira ([5]) utvrdila minimalne mjere koje države članice moraju poduzeti protiv prstenaste truleži gomolja krumpira;

([1]) SL C 93, 2.4.1993., str. 12.
([2]) SL C 176, 28.6.1993., str. 210.
([3]) SL C 161, 14.6.1993., str. 18.
([4]) SL L 26, 31.1.1977., str. 20. Direktiva kako je zadnje izmijenjena Direktivom Komisije 92/103/EEZ (SL L 363, 11.12.1992., str. 1.).
([5]) SL L 180, 14.7.1980., str. 30.

budući da je od tada došlo do značajnog razvoja u razumijevanju bolesti prstenaste truleži gomolja krumpira i otkrivanju patogena prstenaste truleži gomolja krumpira;

budući da primjena režima zdravlja biljaka Zajednice u Zajednici kao području bez unutarnjih granica zahtijeva ponovno ispitivanje i izmjenu nekih odredaba Direktive 80/665/EEZ;

budući da je kao rezultat takvog ponovnog ispitivanja utvrđeno da su odredbe Direktive 80/665/EEZ nedovoljne i potrebna je daljnja specifikacija mjera;

budući da u toj situaciji Direktiva 80/665/EEZ treba biti stavljena izvan snage, a potrebne mjere usvojene;

budući da mjere trebaju prvo uzeti u obzir da bolest može ostati latentna i neprimijećena i u vegetacijskom usjevu i u uskladištenim gomoljima te se tako može učinkovito spriječiti samo proizvodnjom i uporabom sjemenskog krumpira koji nije zaražen, a zatim, da su potrebna sustavna istraživanja za njezino lociranje; budući da širenje patogena unutar vegetacijskog usjeva nije najvažniji čimbenik, već budući da patogen može preživjeti tijekom zime u samoniklim (divljim) biljkama krumpira i one su glavni izvor zaraze koja se prenosi iz jedne sezone u drugu; budući da se patogen širi uglavnom kontaminacijom krumpira putem kontakta sa zaraženim krumpirima i putem kontakta s opremom za sadnju, vađenje i postupanje ili s prijevoznim i skladišnim spremnicima koji su kontaminirani tim organizmom prethodnim kontaktom sa zaraženim krumpirom; budući da takvi kontaminirani predmeti mogu ostati zarazni neko vrijeme nakon takve kontaminacije; budući da se širenje patogena može smanjiti ili spriječiti dezinfekcijom takvih predmeta; budući da svaka takva kontaminacija sjemenskog krumpira predstavlja velik rizik od širenja patogena;

budući da za utvrđivanje pojedinosti takvih općenitih mjera, kao i za one strože ili dodatne mjere koje poduzimaju države članice za sprečavanje uvođenja patogena na njihovo državno područje, poželjno je da države članice tijesno surađuju s Komisijom unutar Stalnog odbora za zdravlje biljaka (dalje u tekstu: „Odbor”),

DONIJELO JE OVU DIREKTIVU:

Članak 1.

Direktiva se odnosi na mjere koje se trebaju poduzeti unutar država članica protiv *Clavibacter michiganensis (Smith) Davis et al.* ssp. *sepedonicus (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al.*, uzročnika prstenaste truleži gomolja krumpira (dalje u tekstu: „organizam”), kako bi se:

(a) locirala i odredila njegova distribucija;

(b) spriječila njegova pojava i širenje; i

(c) ako se pronađe, spriječilo njegovo širenje i kako bi bio pod nadzorom s ciljem iskorjenjivanja.

Članak 2.

1. Države članice moraju provoditi sustavna službena istraživanja za organizme na gomoljima i, kada je to potrebno, na biljkama krumpira (*Solanum tuberosum L.*) koje potječu iz njihovog državnog područja kako bi se potvrdila odsutnost organizma.

Za ta istraživanja, u slučaju gomolja, uzimaju se uzorci i sjemenskog i drugog krumpira, po mogućnosti iz partija u skladištu i podvrgavaju se službenom ili službeno nadziranom laboratorijskom ispitivanju primjenom metode predviđene u Prilogu I. za otkrivanje i dijagnozu organizma. Osim toga, kada je to potrebno, može se izvršiti službeni ili službeno nadzirani vizualni pregled rezanjem gomolja na drugim uzorcima.

U slučaju biljaka, ti se pregledi vrše prema prikladnim metodama i uzorci se podvrgavaju prikladnom službenom ili službeno nadziranom testiranju.

O broju, podrijetlu, stratifikaciji i vremenskom rasporedu prikupljanja uzorka odlučuju odgovorna službena tijela u smislu Direktive 77/93/EEZ na temelju jasnih znanstvenih i statističkih načela i biologije organizma i uzimajući u obzir određene sustave proizvodnje krumpira država članica na koje se to odnosi. Pojedinosti o njima godišnje se podnose drugim državama članicama i Komisiji kako bi se zajamčile usporedive razine jamstva između država članica o potvrdi odsustva organizma.

2. O rezultatima službenih istraživanja iz stavka 1. obavješćuju se druge države članice i Komisija barem jednom godišnje. Detalji ove obavijesti su povjerljivi. Mogu se dostaviti Odboru u skladu s postupkom utvrđenim u članku 16.a Direktive 77/93/EEZ.

3. Sljedeće se odredbe mogu usvojiti u skladu s postupkom utvrđenim u članku 16.a Direktive 77/93/EEZ:

— pojedinosti istraživanja iz stavka 1. istoga, koji se provode u skladu s jasnim znanstvenim i statističkim načelima,

— detalji obavješćivanja iz stavka 2. istoga.

4. Sljedeće se odredbe usvajaju u skladu s postupkom utvrđenim u članku 16.a Direktive 77/93/EEZ:

— prikladna metoda za istraživanja i ispitivanje iz trećeg podstavka stavka 1. gore.

Članak 3.

Države članice moraju osigurati da se o sumnjivoj pojavi ili potvrđenoj prisutnosti organizma, kod biljaka i gomolja krumpira ili izvađenih, uskladištenih ili merkantilnih gomolja na njihovom državnom području, obavješćuju njihova odgovorna službena tijela.

Članak 4.

1. U slučajevima sumnje na zarazu, odgovorna službena tijela države članice u kojoj je obaviješteno o tim slučajevima moraju osigurati provođenje službenog ili službeno nadziranog laboratorijskog testiranja koristeći metodu utvrđenu u Prilogu I. i u skladu s uvjetima određenim u točki 1. Priloga II. kako bi se potvrdila ili opovrgla sumnjiva pojava. U prvom se slučaju primjenjuju zahtjevi utvrđeni u točki 2. Priloga II.

2. Do potvrđivanja ili opovrgavanja sumnjive pojave sukladno stavku 1., u onim slučajevima sumnje na zarazu u kojima bilo da:

i. su primijećeni sumnjivi dijagnostički vizualni simptomi; ili

ii. je utvrđen pozitivan test imunofluorescencije kao što je određeno u Prilogu I. ili neki drugi prikladan pozitivan test;

odgovorna službena tijela država članica moraju:

(a) zabraniti kretanje svih količina ili pošiljki iz kojih su uzeti uzorci, osim pod njihovom kontrolom i pod uvjetom da je utvrđeno da nema prepoznatljivog rizika od širenja organizma;

(b) poduzeti korake za traženje podrijetla sumnje na zarazu;

(c) uvesti prikladne dodatne mjere predostrožnosti na temelju stupnja procijenjenog rizika kako bi spriječilo daljnje širenje organizma. Te mjere mogu uključivati službenu kontrolu kretanja svih drugih gomolja ili biljaka unutar ili izvan objekata povezanih sa sumnjom na zarazu.

3. Sljedeća se odredba može usvojiti u skladu s postupkom utvrđenim u članku 16.a Direktive 77/93/EEZ:

— mjere navedene u gornjem stavku 2. točki (c)

4. Sljedeća se odredba usvaja u skladu s postupkom utvrđenim u članku 16.a Direktive 77/93/EEZ:

— drugi prikladan test predviđen u gornjem stavku 2. točki ii.

Članak 5.

1. Ako se službenim ili službeno nadziranim laboratorijskim testiranjem, koristeći metodu određenu u Prilogu I., potvrdi prisutnost organizma u uzorku gomolja, biljaka ili dijelova biljaka, odgovorna službena tijela države članice, uzimajući u obzir jasna znanstvena načela, biologiju organizma i određenu proizvodnju, marketinške i prerađivačke sustave u toj državi članici, moraju:

(a) označiti kao kontaminirane gomolje ili biljke, pošiljke i/ili količine, kao i strojeve, vozilo, posudu, skladište ili jedinice istih te sve druge predmete uključujući ambalažu iz koje je uzet uzorak i, kada je to potrebno, mjesto (mjesta) proizvodnje i polje (polja) na kojem (kojima) su gomolji ili biljke ubirani;

(b) odrediti, uzimajući u obzir odredbe točke 1. Priloga III., raspon moguće kontaminacije putem kontakta prije ili poslije branja ili putem proizvodne veze s označenom kontaminacijom;

(c) demarkirati zonu na temelju označivanja kontaminacije prema točki (a), utvrđivanja raspona moguće kontaminacije prema točki (b) i mogućeg širenja organizma, uzimajući u obzir odredbe točke 2. Priloga III.

2. Države članice moraju bez odgađanja obavijestiti druge države članice i Komisiju, u skladu s odredbama točke 3. Priloga III., o svakoj kontaminaciji označenoj prema stavku 1. točki (a) i detaljima demarkacije zone prema stavku 1. točki (c).

Detalji te obavijesti su povjerljivi. Mogu se podnijeti Odboru u skladu s postupkom utvrđenim u članku 16.a Direktive 77/93/EEZ.

3. Kao rezultat obavijesti prema stavku 2. i elementima koji su u njoj navedeni, druge države članice navedene u obavijesti prema potrebi označuju kontaminaciju, utvrđuju raspon moguće kontaminacije i demarkiraju zonu u skladu sa stavkom 1. točkama (a), (b) odnosno (c).

Članak 6.

Države članice moraju odrediti da se, gdje su gomolji ili biljke označeni kao kontaminirani prema članku 5. stavku 1. točki (a), provede ispitivanje u skladu s člankom 4. stavkom 1. na zalihama krumpira koji su klonski povezani s onima uključenima u kontaminaciju. Ispitivanje se provodi na onoliko gomolja ili biljaka koliko je potrebno da se utvrdi moguć primarni izvor zaraze i raspon moguće kontaminacije, po mogućnosti po redu stupnja rizika.

Na temelju rezultata testiranja, mora se provesti daljnje označivanje kontaminacije, utvrđivanje raspona moguće kontaminacije i demarkacija zone, kada je to potrebno, prema članku 5. stavku 1. točkama (a), (b) odnosno (c).

Članak 7.

1. Države članice moraju odrediti da se gomolji ili biljke označeni kao kontaminirani prema članku 5. stavku 1. točki (a) ne mogu saditi te da se, pod kontrolom njihovih odgovornih službenih tijela:

— uništavaju, ili

— na drugi način odlože, ovisno o službeno nadziranoj mjeri (mjerama), u skladu s odredbama točke 1. Priloga IV., pod uvjetom da je utvrđeno da nema prepoznatljivog rizika od širenja organizma.

2. Države članice moraju odrediti da se gomolji ili biljke za koje se utvrdi da su vjerojatno kontaminirani prema članku 5. stavku 1. točki (b) ne smiju saditi te da se, ne dovodeći u pitanje ishod testiranja iz članka 6. za klonski povezane zalihe, pod kontrolom njihovih odgovornih službenih tijela, stave na prikladan način upotrebe ili odlože, kako je navedeno u točki 2. Priloga IV., tako da se utvrdi da nema ustanovljenog rizika od širenja organizma.

3. Države članice moraju odrediti da se svi strojevi, vozila, posude, skladišta ili jedinice istih te svi drugi predmeti uključujući ambalažu, koji su označeni kao kontaminirani prema članku 5. stavku 1. točki (a) ili utvrđeni kao vjerojatno kontaminirani prema članku 5. stavku 1. točki (b), ili uništavaju ili čiste i dezinficiraju uz korištenje prikladnih metoda kako je navedeno u točki 3. Priloga IV. Nakon dezinfekcije, svaki takav predmet više se neće smatrati kontaminiranim.

4. Ne dovodeći u pitanje mjere primijenjene prema stavcima 1., 2. i 3., države članice moraju odrediti da se u zoni demarkiranoj prema članku 5. stavku 1. točki (c) provodi niz mjera, kako je navedeno u točki 4. Priloga IV.

Članak 8.

1. Države članice moraju odrediti da sjemenski krumpir mora udovoljavati zahtjevima Direktive 77/93/EEZ i potjecati izravnom linijom od materijala dobivenog iz službeno odobrenog programa, za koji je utvrđeno službenim ili službeno nadziranim testiranjem, koristeći metodu predviđenu u Prilogu I, da je slobodan od organizama.

Gore navedeno testiranje vrši se:

— u slučajevima u kojima kontaminacija utječe na proizvodnju sjemenskog krumpira, na biljkama inicijalne klonske selekcije,

— u drugim slučajevima, bilo na biljkama inicijalne klonske selekcije ili na reprezentativnim uzorcima osnovnog sjemenskog krumpira ili ranijih razmnožavanja.

2. Sljedeće se odredbe mogu usvojiti u skladu s postupkom utvrđenim u članku 16.a Direktive 77/93/EEZ:

— detaljna pravila primjene stavka 1. drugog podstavka prve alineje ovog članka,

— pravila koja se odnose na reprezentativne uzorke predviđene u stavku 1. drugom podstavku drugoj alineji ovog članka.

Članak 9.

Države članice moraju zabraniti posjedovanje ili postupanje organizmom.

Članak 10.

Ne dovodeći u pitanje odredbe Direktive 77/93/EEZ, države članice smiju odobriti odstupanja od mjera iz članaka 6., 7. i 9. ove Direktive u eksperimentalne i znanstvene svrhe i zbog rada na sortnoj selekciji, pod uvjetom da takva odstupanja ne dovode u pitanje kontrolu organizma i ne stvaraju rizik od širenja organizma.

Članak 11.

Države članice smiju usvojiti one dodatne ili strože mjere koje mogu biti potrebne za suzbijanje organizma ili za sprečavanje njegovog širenja, u onoj mjeri u kojoj su u skladu s odredbama Direktive 77/93/EEZ.

Dodatne mjere iz prvog podstavka mogu uključivati određivanje da se može saditi samo onaj sjemenski krumpir koji je ili službeno certificiran ili je službenom inspekcijom utvrđeno da udovoljava potrebnim standardima zdravlja biljaka. To drugo se može primijeniti posebno u slučaju kad je poljoprivrednicima odobreno upotrijebiti, na vlastitim gospodarstvima, sjemenski

krumpir koji su dobili iz vlastite berbe i u drugim slučajevima u kojima se sadi sjemenski krumpir iz vlastite proizvodnje.

O pojedinostima ovih mjera obavješćuju se druge države članice i Komisija.

Članak 12.

Izmjene Priloga ovoj Direktivi koje se izrađuju u svjetlu znanstvenih i tehničkih saznanja primjenjuju se u skladu s postupkom utvrđenim u članku 16.a Direktive 77/93/EEZ.

Članak 13.

1. Države članice moraju do 15. studenoga 1993. donijeti i objaviti odredbe potrebne za usklađivanje s ovom Direktivom. One o tome moraju odmah obavijestiti Komisiju.

Kada države članice usvoje te odredbe, te odredbe u vrijeme njihove službene objave moraju sadržavati uputu na ovu Direktivu ili se uz njih mora navesti takva uputa. Postupak takvog upućivanja moraju usvojiti države članice.

Države članice ove odredbe moraju primjenjivati od 16. studenoga 1993.

2. Države članice moraju bez odgađanja obavijestiti Komisiju o svim odredbama nacionalnog zakona koje donesu na području na koje se odnosi ova Direktiva. Komisija će o njima obavijestiti druge države članice.

Članak 14.

Direktiva 80/665/EEZ ovime se stavlja izvan snage s učinkom od 16. studenoga 1993.

Članak 15.

Ova je Direktiva upućena državama članicama.

Sastavljeno u Luxembourgu 4. listopada 1993.

Za Vijeće
Predsjednik
W. CLAES

PRILOG I.

METODA ZA OTKRIVANJE I DIJAGNOZU BAKTERIJE PRSTENASTE TRULEŽI, CLAVIBACTER MICHIGANENSIS (Smith) Davis et al. ssp. SEPEDONICUS (Spieckermann et Kotthof) Davis et al. U SKUPINAMA GOMOLJA KRUMPIRA

1. **Uklanjanje jezgri s pupaka gomolja**

1.1. Operite 200 gomolja u tekućoj vodi i uklonite epidermu oko pupka svakoga gomolja koristeći pravilno dezinficirani skalpel ili rezač krumpira; dezinfekcija se može postići uronjavanjem rezača u 70 % etanol i spaljivanjem na plameniku.

1.2 Pažljivo uklonite čunjaste jezgre tkiva s pupka gomolja nožem ili rezačem krumpira. Neka prekomjerno neprovodno tkivo ostane na minimumu. Kad se uklone, pupci gomolja se trebaju procesirati u roku od 24 sata (vidjeti stavak 3.) ili čuvati na – 20 °C ne duže od dva tjedna.

2. **Vizualni pregled simptoma prstenaste truleži**

Nakon uklanjanja pupaka, poprečno prerežite svaki gomolj i promatrajte prisutnost simptoma prstenaste truleži.

Zgnječite gomolje i potražite izraženost maceriranih tkiva iz provodnog tkiva.

Najraniji simptomi su lagana staklenost ili djelomična prozirnost tkiva bez omekšanja oko provodnog sustava, posebno u blizini pupka gomolja. Provodni prsten na pupku gomolja može biti lagano tamnije boje od uobičajene. Prvi simptom koji se lako može utvrditi je onaj prema kojem provodni prsten ima žućkastu boju, a kada se gomolj lagano zgnječi, iz žila se pojavljuju stupovi materijala slični siru. To lučenje sadrži milijune bakterija. U ovom stadiju može se razviti posmeđivanje provodnog tkiva. U početku, ti simptomi mogu biti ograničeni na jedan dio prstena, ne nužno blizu pupka gomolja i mogu se postupno proširiti na cijeli prsten. Kako infekcija napreduje, dolazi do uništenja provodnog tkiva; vanjska kora može se odvojiti od unutarnje kore. U naprednim stadijima infekcije, na površini gomolja pojavljuju se pukotine, koje su često crvenkasto-smeđe po rubovima. Sekundarni gljivični ili bakterijski napad može prikriti simptome i može biti teško, čak nemoguće, razlikovati uznapredovale simptome prstenaste truleži od drugih truleži gomolja.

3. **Priprema uzoraka za bojenje po Gramu, bojenje imunofluorescencijom (IF) i test s patlidžanom**

3.1. Homogenizirajte pupke gomolja dok se ne postigne potpuno maceriranje u sredstvu za razrjeđivanje koje nije toksično za *Corynebacterium sepedonicum* (na primjer 0,05 M fosfatni pufer (*phosphate buffered saline* - PBS) pH 7,0) na najmanjoj temperaturi od 30 °C; uputno je dodavanje netoksičnog deflokulanta i može biti potreban netoksični agens protiv pjenjenja (Dodaci 1. i 2.). Treba izbjegavati prekomjerno maceriranje.

3.2. Izvadite bakterije iz homogenata jednom od metoda kako slijedi [1]:

A. (a) Centrifugirajte na najviše 180 g 10 minuta;

(b) Centrifugirajte supernatant na najmanje 4 000 g 10 minuta. Pretočite i odbacite supernatant.

B. (a) Neka macerat stoji 30 minuta kako bi se ostaci tkiva slegli. Pretočite supernatant, ali nemojte pomiješati s sedimentom;

(b) Filtrirajte supernatant kroz filtar-papir (Whatman br. 1) pohranjen u sinteriranom staklenom filtru (br. 2 = 40-100 µm) koristeći vodenu vakuum cijev. Pokupite filtrat u epruvetu za centrifugiranje. Operite filtar sa sterilnim PBS-om do maksimalnog volumena filtrata od 35 ml;

(c) Centrifugirajte filtrat na najmanje 4 000 g 20 minuta.

3.3. Odvojite resuspendirani talog u sterilni 0,01 M fosfatni pufer pH 7,2 (Dodatak 2.) kako bi dobili ukupan volumen od približno 1 ml. Podijelite na dva jednaka dijela i zadržite jedan dio u referentne svrhe smrzavanjem na – 20 °C [2] ili liofilizacijom. Podijelite drugi dio na polovice koristeći jednu polovicu za IF test i bojenje po Gramu, a drugu za test s patlidžanom.

[1] Alternativnu metodu za izlučivanje daje Dinesen, 1984.
[2] Postoje dokazi (Janse i Van Vaerenberg, 1987.) da smrzavanje može smanjiti vijabilnost *Corynebacterium sepedonicuma*. Suspenzija resuspendiranog taloga u 10 % glicerolu može prevladati taj problem.

3.4 Krajnje je neophodno da se sve kontrole i uzorci pozitivnog *C. sepedonicuma* tretiraju odvojeno kako bi se izbjegla kontaminacija. To se odnosi na IF objektna stakalca mikroskopa i testove s patlidžanima.

4. *Bojenje po Gramu*

4.1. Pripremite preparate za bojenje po Gramu za sve razrijeđene otopine resuspendiranog taloga (5.2.1.) i za sve prerezane gomolje (2.) koji pokazuju staklenost, truljenje ili druge sumnjive simptome. Uzorci se trebaju uzeti s ruba bolesnih tkiva.

4.2. Pripremite preparate za bojenje po Gramu za poznate kulture *C. sepedonicuma* i, ako je moguće, za prirodno zaražena tkiva (5.1.).

4.3. Odredite koji uzorci sadrže karakteristične Gram pozitivne korineformne stanice. Općenito, stanice *C. sepedonicuma* su dugačke od 0,8 do 1,2 μm i široke od 0,4 do 0,60 μm.

Prikladan postupak bojenja navodi se u Dodatku 3.

Pripravci iz prirodno zaraženih ili nedavno izoliranih kultura često pokazuju da prevladavaju kokoidni štapići koji su obično malo manji nego stanice drugih agar kultura. Na većini hranjivih podloga, stanice *C. sepedonicuma* su pleomorfni korineformni štapići i Gram reakcija može biti promjenjiva. Stanice su pojedinačne, u parovima s karakterističnim „laktovima" tipičnim za savinutu podjelu i povremeno u nepravilnim skupinama koje se često nazivaju palisadama i kineskim pismom.

5. **Shema za IF testiranje**

5.1. Upotrijebite antiserum na poznatu vrstu *C. sepedonicuma* - ATCC 33113 (NCPPB 2137) ili NCPPB 2140. To treba imati IF titar više od 1:600. Uključite jednu kontrolu PBS-om na testnom stakalcu kako bi utvrdili da li se fluorescein izotiocijanat anti-zečji imunoglobulinski konjugat (FITC) netipično spaja s bakterijskim stanicama. *Corynebacterium sepedonicum* (ATCC 33113 (NCPPB 2137), NCPPB 2140) se treba upotrijebiti kao homologne antigenske kontrole na odvojenom stakalcu. Prirodno zaraženo tkivo (održavano liofilizacijom ili smrzavanjem na – 20 °C) treba se upotrijebiti gdje je to moguće kao slična kontrola na istom stakalcu (Slika 2.).

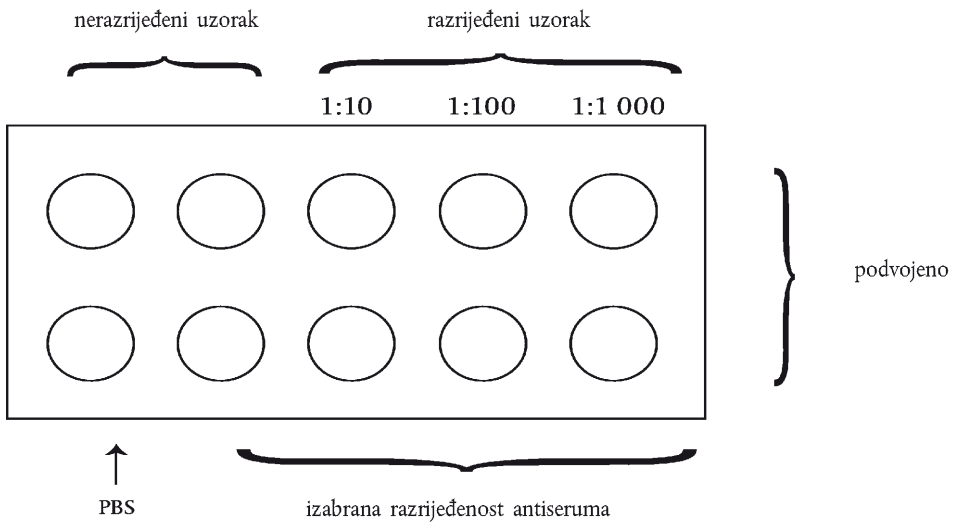
5.2. *Postupak*

5.2.1. Pripremite tri serijske deseterostruko razrijeđene otopine (10^1, 10^2, 10^3) posljednjeg resuspendiranog taloga u destiliranoj vodi (Slika 1.).

5.2.2. Pipetom odredite izmjereni standardni volumen dovoljan da pokrije prozor (približno 25 μl) svake razrijeđene otopine resuspendiranog taloga ili suspenzije *C. sepedonicuma* (približno 10^6 stanica/ml) na prozore višestruko obojenog stakalca kao što je prikazano na Slici 1.

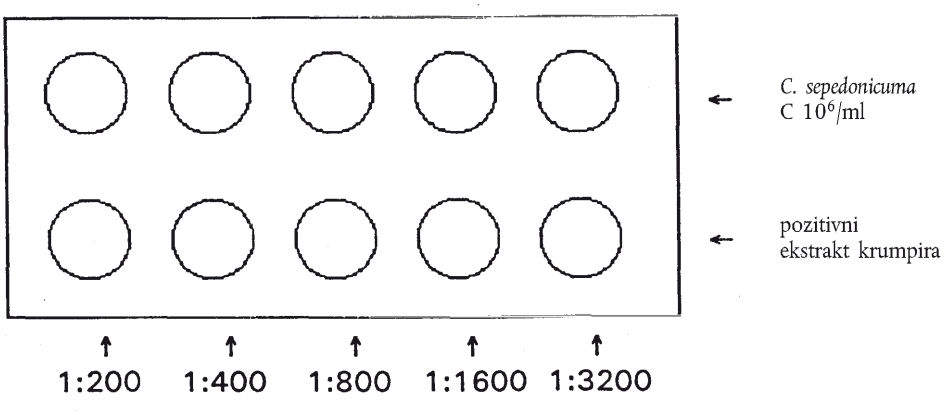
Slika 1.

Stakalce s uzorkom i PBS kontrolom



Slika 2.

Stakalce pozitivne kontrole



5.2.4. Prekrijte prikladne prozore s antiserumom *C. sepedonicuma* u preporučenim razrijeđenim otopinama, 0,01 M PBS pH 7,2 (Dodatak 2.), kao što je prikazano na Slici 1. (Upotrijebite PBS za FITC kontrolu). Radna razrijeđena otopina antiseruma trebala bi biti približno polovica one IF titra. Ako se uključuju druge razrijeđene otopine antiseruma, trebaju se pripremiti odvojena stakalca za svaku razrijeđenu otopinu koja će se koristiti.

5.2.5. Inkubirajte u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi 30 minuta.

5.2.6. Pažljivo isperite s 0,01 M PBS pH 7,2. Perite pet minuta u tri promjene 0,01 M PBS pH 7,2.

5.2.7. Pažljivo uklonite prekomjernu vlagu.

5.2.8. Pokrijte svaki prozor s FITC konjugatom u istoj razrijeđenoj otopini upotrijebljenoj za određivanje titra i inkubirajte u tamnoj vlažnoj komori na sobnoj temperaturi 30 minuta.

5.2.9. Isperite i operite kao i ranije.

5.2.10. Primijenite približno 5 do 10 µl 0,1 M fosfatnog pufera (PBS) pH 7,6 (ili sličan montant čiji pH nije manji od 7,6) na svaki prozor i pokrijte pokrovnim stakalcem (Dodatak 2.).

5.2.11 Ispitajte mikroskopom opremljenim epifluorescentnim izvorom svjetla i filtrima pogodnim za rad s FITC-om. Prikladno je povećanje od 400 do 1 000. Skenirajte replicirane prozore preko dva promjera pod pravim kutom i oko perimetara prozora.

Promatrajte fluorescirajuće stanice u pozitivnim kontrolama i odredite titar. Promatrajte fluorescirajuće stanice u FITC/PBS kontrolnom prozoru i ako nisu prisutne, nastavite s testnim prozorima. Odredite u minimalno 10 mikroskopskih polja prosječan broj morfološki tipičnih fluorescirajućih stanica po polju i izračunajte broj nerazrijeđenog resuspendiranog taloga po ml (Dodatak 4.).

Ima nekoliko problema svojstvenih testu imunofluorescencije.

— Pozadinske populacije fluorescirajućih stanica s atipičnom morfologijom i saprofitskim bakterijama iz lančane reakcije veličinom i morfologijom sličnom *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicusu* mogle bi se pojaviti u resuspendiranim talozima krumpira. Uzmite u obzir samo fluorescirajuće stanice s tipičnom veličinom i morfologijom.

  Zbog mogućnosti lančanih reakcija, uzorci s pozitivnim testom imunofluorescencije trebaju se ponovno testirati uporabom drukčijeg antiseruma.

— Tehničko ograničenje otkrivanja ove metode nalazi se između 10^3 i 10^4 stanice po ml nerazrijeđenog resuspendiranog taloga. Uzorci sa zbrojem tipičnih IF stanica na granici otkrivanja obično su negativni za *C. m.* ssp. *sepedonicus,* ali mogu se uputiti na testiranje s patlidžanom.

Negativni test imunofluoresencije se utvrđuje za svaki uzorak u kojem nisu pronađene morfološki tipične fluorescirajuće stanice. Uzorci se smatraju *„nekontaminiranim"* s *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicusom.*

Test s patlidžanom nije potreban.

Pozitivni test imunofluorescencije se utvrđuje za svaki uzorak u kojem su pronađene morfološki tipične fluorescirajuće stanice.

Uzorci za koje je utvrđen pozitivan test imunofluorescencije s oba antiseruma smatraju se *„potencijalno kontaminiranim"* s *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicusom.*

Test s patlidžanom je potreban za sve uzorke koji se smatraju potencijalno kontaminiranim.

6. **Test s patlidžanom**

Za detalje kulture, vidjeti Dodatak 5.

6.1. Raspodijelite resuspendirani talog iz 3.3. na najmanje 25 patlidžana u lisnatom stadiju 3 (Dodatak 5.) jednom od metoda navedenih dalje u tekstu (6.2., 6.3. ili 6.4.).

6.2 *Inokulacija prorezom I*

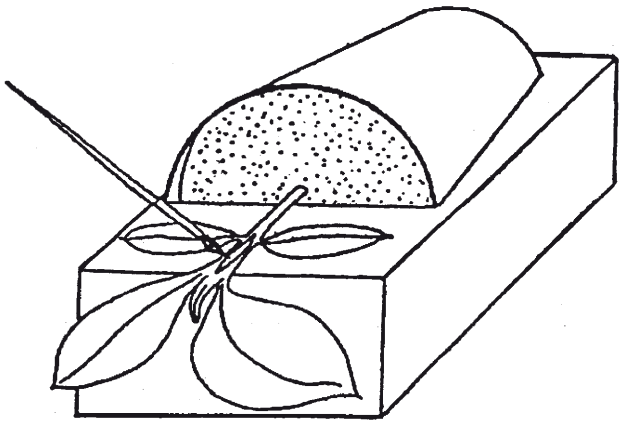
6.2.1. Vodoravno poduprite svaki lonac (blok raširenog polistirena s komadom 5 cm dubokim × 10 cm širokim × 15 cm dugačkim, uklonjen s jedne površine (Slika 3.) je prikladan za posudu od 10 cm). Traka sterilne aluminijske folije treba se staviti između peteljke i bloka za svaki testirani uzorak. Biljka se može zadržati na mjestu gumenom trakom oko bloka.

6.2.2. Skalpelom napravite uzdužni ili lagano dijagonalni rez 0,5 do 1,0 cm dugačak i dubok približno tri četvrtine od promjera peteljke, između supki i prvog lista.

6.2.3. Držite prorez otvorenim vrhom oštrice skalpela i u njega obojite inokulum koristeći kist za oči ili fini slikarski kist napunjen resuspendiranim talogom. Raspodijelite ostatak resuspendiranog taloga na patlidžane.

6.2.4. Čvrsto zatvorite rez sterilnim vazelinom iz valjka štrcaljke od 2 ml.

Slika 3.



6.3. *Inokulacija prorezom II*

6.3.1. Držeći biljku između dva prsta, pipetom kapnite kap (približno 5 do 10 µl) oduzetog resuspendiranog taloga na peteljku između supki i prvog lista.

6.3.2. Koristeći sterilni skalpel, napravite dijagonalni (pod kutom od približno 5 °) prorez, 1,0 cm dugačak i dubok približno 2/3 debljine peteljke, počevši rez od kapi resuspendiranog taloga.

6.3.3. Čvrsto zatvorite rez sterilnim vazelinom iz valjka štrcaljke.

6.4. *Inokulacija štrcaljkom*

6.4.1. Nemojte prati peteljke patlidžana jedan dan prije inokulacije kako bi se smanjio turgor.

6.4.2. Inokulirajte stabljike patlidžana malo iznad supki koristeći štrcaljku koja ima potkožnu iglu (najmanje 23G). Raspodijelite resuspendirani talog na patlidžane.

6.5. Inokulirajte 25 biljaka poznatom kulturom *C. sepedonicuma* i, gdje je to moguće, prirodno zaraženim tkivima gomolja (5.1.) istom metodom inokulacije (6.2., 6.3. ili 6.4.).

6.6. Inokulirajte 25 biljaka sterilnim 0,05 M PBS-om istom metodom inokulacije (6.2., 6.3. ili 6.4.).

6.7. Inkubirajte biljke u prikladnim uvjetima (Dodatak 5.) 40 dana. Redovito provjerite simptome nakon osam dana. Prebrojite broj biljaka koje pokazuju simptome. *C. sepedonicum* uzrokuje uvenuće lišća kod patlidžana koje može početi kao marginalna ili interžilna mlitavost. Uvenulo tkivo može u početku izgledati tamnozeleno ili prošarano, ali postaje bljeđe prije nego što postane nekrotično. Interžilna uvenuća često izgledaju masno, kao da su natopljena vodom. Nekrotično tkivo često ima svijetložuti rub. Biljke nužno ne ugibaju; što je razdoblje prije nego što se simptomi razviju dulje, to je veća mogućnost preživljavanja. Biljke mogu prerasti zarazu. Nježne mlade biljke patlidžana mnogo su osjetljivije na niske populacije *C. sepedonicuma* nego starije biljke; odatle potreba za korištenjem biljaka u ili neposredno prije stadija tri prava lista.

Uvenuća također mogu biti uzrokovana populacijama drugih bakterija ili gljivica koje su prisutne u resuspendiranom talogu tkiva gomolja. To su: *Erwinia carotovora,* subsp. *carotovora* i *E. carotovora* subsp. *atroseptica, Phoma exigua* var. *foveata,* kao i velike populacije saprofitskih bakterija. Takva uvenuća mogu se razlikovati od onih koje uzrokuje *C. sepedonicum* s obzirom da cijeli listovi ili cijele biljke brzo venu.

6.8. Pripremite bojenje po Gramu (4) za sve skupine patlidžana koji pokazuju simptome koristeći dijelove uvenulog tkiva lišća i tkiva stabljike te ih izolirajte na prikladnim hranjivim podlogama (7). Površinski dezinficirajte lišće i stabljike patlidžana brisanjem 70 % etanolom.

6.9. U određenim okolnostima, posebno kad uvjeti za rast nisu optimalni, moguće je da *C. sepedonicum* postoji kao latentna infekcija u patlidžanu čak i nakon inkubacije od 40 dana. Takve infekcije mogu rezultirati kržljavošću i nedostatkom vitalnosti u inokuliranim biljkama. Ako se IF test smatra pozitivnim, daljnje se testiranje može smatrati nužnim. Stoga je temeljno usporediti stope rasta svih testiranih biljaka patlidžana s inokuliranim kontrolama sterilnim 0,05 M PBS-om i nadzirati okolišne uvjete staklenika.

Preporuke za daljnja testiranja su kako slijedi:

6.9.1. izrežite peteljke iznad mjesta inokulacije i uklonite lišće;

6.9.2. namočite stabljike u 0,05 M PBS pH 7,0 kako je navedeno u 3.1. do 3.2.;

6.9.3. upotrijebite pola resuspendiranog taloga kako bi izveli bojenje po Gramu (4) i IF test (5);

6.9.4. upotrijebite drugu polovicu kako bi izveli daljnji test s patlidžanom (6) ako su bojenje po Gramu i/ili IF testovi pozitivni. Upotrijebite poznatu kulturu *C. sepedonicuma* i kontrole sterilnim 0,05 M PBS-om. Ako se simptomi ne uoče u daljnjem testu, uzorak se mora smatrati negativnim.

7. **Izolacija *C. sepedonicuma***

Dijagnoza se može potvrditi samo ako se *C. sepedonicum* izolira i tako identificira (8). Iako je *C. sepedonicum* složeni organizam, može se izolirati iz simptomatskog tkiva. Međutim, mogu ga prerasti brzo rastuće saprofitske bakterije te se stoga ne preporučuju izolacije izravno iz resuspendiranog taloga tkiva gomolja (3.3.). Patlidžani pružaju izvrsnu selektivnu obogaćenu podlogu za rast *C. sepedonicuma* i također pružaju izvrstan potvrdan test za nametnika.

Izolacije se trebaju vršiti iz svih simptomatskih gomolja krumpira i patlidžana (4., 6.). Maceriranje peteljki patlidžana treba se, prema potrebi, provoditi kako je navedeno u 3. i 6.9.

7.1. Nanesite suspenziju u tankom sloju na jednu od sljedećih podloga: (formule su navedene u Dodatku 6.):

hranjivi agar s dodatkom dekstroze (samo za subkulture),

agar s dodatkom kvasca, peptona i glukoze,

hranjivi agar s dodatkom kvasca i dekstroze,

agar s dodatkom ekstrakta kvasca i mineralnih soli.

Inkubirajte na 21 °C do 20 dana.

C. sepedonicum sporo raste, obično stvarajući kremaste, kupolaste kolonije sa šiljatim vrhom unutar 10 dana.

Ponovno nanesite u tankom sloju kako bi postigli čistoću.

Stope rasta se poboljšavaju sa subkulturom. Tipične kolonije su kremasto-bijele ili poput bjelokosti, zaokružene, glatke, povišene, konveksno-kupolaste, sluzavo-tekuće, s cijelim rubovima i obično promjera od 1 do 3 mm.

Identifikacija

Mnoge Gram pozitivne corineformne bakterije, s kolonijalnim karakteristikama sličnim onima *C. sepedonicuma*, mogu se izolirati iz zdravih ili zaraženih krumpira ili patlidžana. U tom kontekstu *C. sepedonicum* se mora identificirati sljedećim testovima:

IF test (5.1.),

test s patlidžanom,

nutricioni i fiziološki testovi (Dodatak 7.),

— test oksidacije/fermentacije (O/F),

— test oksidaze,

— rast na 37 °C,

— stvaranje ureaze,

— hidroliza eskulina,

— hidroliza škroba,

— tolerancija 7 % otopine natrij-klorida,

— test indola,

— test katalaze,

— stvaranje $H_2$8,

— korištenje citrata,

— hidroliza želatine,

— kiseline iz: glicerola, laktoze, ramnoze i salicina,

— bojenje po Gramu.

Svi testovi trebaju uključivati poznatu kontrolu *C. sepedonicuma*. Nutricioni i fiziološki testovi trebaju se napraviti koristeći inokulume iz subkultura hranjivog agara. Morfološke usporedbe trebaju se napraviti iz kultura hranjivih agara s dodatkom dekstroze.

Za IF test, stanične se populacije trebaju namjestiti na 10^6 stanica/ml. IF titar treba biti sličan onome poznate kulture *C. sepedonicuma*.

Za test s patlidžanima stanične se populacije trebaju namjestiti na c 10^7 stanica/ml. Testovi s patlidžanima trebaju se izvršiti koristeći 10 biljaka za svaki od testiranih organizama, ponovo koristeći poznatu kulturu C. sepedonicuma i kontrole sterilne vode; s čistim kulturama tipično bi se uvenuće trebalo postići unutar 20 dana, ali biljke koje ne pokazuju simptome nakon tog vremena trebaju se inkubirati ukupno 30 dana na temperaturi pogodnoj za rast patlidžana, ali koja ne prelazi 30 °C (Dodatak 5.). Ako simptomi nisu prisutni nakon 30 dana, ne može se potvrditi da je kultura patogeni oblik *Corynebacterium sepedonicuma*.

Test	*C. sepedonicum*
O/F	inertno ili slabo oksidativan
Oksidaza	–
Katalaza	+
Redukcija nitrata	–
Aktivnost ureaze	–
Stvaranje H_2S	–
Stvaranje indola	–
Korištenje citrata	–
Hidroliza škroba	– ili slaba
Rast na 37 °C	–
Rast u 7 % NaCl	–
Hidroliza želatine	–
Hidroliza eskulina	+
Kiselina iz:	
— glicerola	–
— laktoze	– ili slaba
— ramnoze	–
— salicina	–

Dodatak 1.

FORMULACIJA MACERIRANJA FLUIDA PREMA PREPORUCI LELLIOTTA I SELLARA, 1976.

D C silikonski agens protiv pjenjenja MS A spoj (Hopkins & Williams Ltd, Cat. No 9964-25, Chadwell Heath, Essex, Engleska)	10 ml
Lubrol W listići (ICI Ltd)	0,5 g
Tetra-natrij pirofosfat	1 g
0,05 M fosfatni pufer (PBS) pH 7,0 (Dodatak 2.)	1 litra

Dodatak 2.

PUFERI

0,05 M fosfatni pufer (PBS) pH 7,0

Ovaj se pufer može upotrijebiti za maceriranje tkiva gomolja (2.1.)

Na_2HPO_4	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
NaCl	8,0 g
Destilirana voda do	1 litre

0,01 M fosfatni pufer (PBS) pH 7,2

Ovaj se pufer može upotrijebiti za razrjeđivanje antiseruma i pranje IF stakalca

Na_2HPO_4 12 H_2O	2,7 g
NaH_2PO_4 2 H_2O	0,4 g
NaCl	8,0 g
Destilirana voda do	1 litre

0,1 M glicerin fosfatni pufer pH 7,6

Ovaj se pufer koristi kao montant za pojačavanje fluorescencije u IF testu

Na_2HPO_4 12 H_2O	3,2 g
NaH_2PO_4 2 H_2O	0,15 g
Glicerol	50 ml
Destilirana voda	100 ml

Dodatak 3.

POSTUPAK BOJENJA PO GRAMU (HUCKEROVA MODIFIKACIJA) (DOETSCH, 1981.)

Otopina kristal violeta

Otopite 2 g kristal violeta u 20 ml 95 % etanola.

Otopite 0,8 g amonij-oksalata u 80 ml destilirane vode.

Promiješajte dvije otopine.

Lugolova otopina

Jod	1 g
Kalij jodid	2 g
Destilirana voda	300 ml.

Smrvite krute tvari zajedno koristeći tučak i mužar. Dodajte vodi i promućkajte da se otopi u zatvorenoj posudi.

Otopina safranina za protubojenje

Osnovna otopina:

Safranin O	2,5 g
95 %-tni etanol	100 ml.

Promiješajte i pohranite.

Razrijedite: 1:10 da bi dobili radnu otopinu.

Postupak bojenja

1. Pripremite razmaze, posušite na zraku i fiksirajte zagrijavanjem.
2. Ispirite stakalce otopinom kristal violeta jednu minutu.
3. Kratko isperite tekućom vodom.
4. Ispirite s Lugolovom otopinom jednu minutu.
5. Isperite tekućom vodom i posušite filtar-papirom.
6. Uklonite boju 95 %-tnim etanolom, koji se dodaje kap po kap, dok se sva boja ne ukloni ili uronite razmaz lagano tresući na 30 sekundi.
7. Isperite tekućom vodom i posušite filtar-papirom.
8. Poplavite otopinom safranina 10 sekundi.
9. Isperite tekućom vodom i posušite filtar-papirom.

Gram pozitivne bakterije se oboje ljubičasto-plavo; Gram negativne bakterije se oboje ružičasto-crveno.

Dodatak 4.

ODREĐIVANJE POPULACIJE IF POZITIVNIH STANICA

Površina (S) jažice stakalca s više jažica

$$= \frac{\pi D^2}{4} \quad (1)$$

gdje je D = promjer prozora.

Površinsko područje (područja) polja objektiva

$$= \frac{\pi d^2}{4} \quad (2)$$

gdje je d = promjer polja.

Izračunajte d bilo izravnim mjerenjem ili iz sljedećih formula:

$$s = \frac{\pi i^2}{G^2K^2 \times 4} \quad (3)$$

gdje je i = koeficijent polja (ovisi o tipu okulara i varira od 8 do 24),
K = koeficijent tubusa (1 ili 1,25),
G = povećanje objektiva (od 100×, 40× itd.),

od (2) $d = \sqrt{\frac{4s}{\pi}}$

od (3) $d = \sqrt{\frac{4 \times \frac{\pi i^2}{G^2K^2 \times 4}}{\pi}} = \frac{i}{GK}$ (4)

Izračunajte broj tipičnih fluorescentnih stanica po vidnom polju (c).

Izračunajte broj tipičnih fluorescentnih stanica po jažici mikroskopskog stakalca (C).

$$C = c\frac{S}{s}$$

Izračunajte broj tipičnih fluorescentnih stanica po ml resuspendiranog taloga (N)

$$N = C \times \frac{1000}{y} \times F$$

gdje je y = volumen resuspendiranog taloga na svakom oknu,

gdje je F = faktor razrjeđivanja resuspendiranog taloga.

Dodatak 5.

KULTURA PATLIDŽANA

Posijte sjeme patlidžana (*Solanum melongena* cv. Black Beauty) u pasteriziranom kompostu za sjetvu. Presadite sadnice s potpuno razvijenim proširenim supkama (od 10 do 14 dana) u pasteriziran kompost u loncu.

Upotrijebite patlidžane u lisnatom stadiju 3 kada su dva, ali najviše tri lista, potpuno izravnana.

Patlidžani se trebaju uzgajati u stakleniku sa sljedećim okolišnim uvjetima:

trajanje dana: 14 sati ili prirodno dnevno svjetlo ako je veće;

temperatura: dan: od 21 do 24 °C,

noć: 15 °C.

NB: *C. sepedonicum* neće rasti na temperaturama > 30 °C. Ako temperatura po noći ne padne na 15 °C, može doći do oštećenja kromofora (srebrnasta nekroza).

Oštećenje korijena uzrokovano sciaridnim ličinkama može se prevladati primjenom prikladnog insekticida.

Patlidžan cv. Black Beauty može se dobiti od:

1. AB Hammenhögs Frö,
   270 50 Hammenhög,
   Švedska;
2. HURST Seeds Ltd,
   Avenue Road,
   Witham,
   Essex CM8 2DX,
   Engleska;
3. ASGRO Italia Sp A,
   Corso Lodi, 23,
   Milano;
4. KÜPPER
   Mitteldeutsche Samen GmbH,
   Hessenring 22,
   D-37269 Eschwege.

Dodatak 6.

PODLOGE ZA RAST I IZOLACIJU *C. SEPEDONICUMA*

Hranjivi agar (NA)

Difco bacto hranjivi agar u destiliranoj vodi po proizvođačkoj stopi. Sterilizirajte u autoklavu na 121 °C 15 minuta.

Hranjivi agar s dodatkom dekstroze (NDA)

Difco bacto hranjivi agar koji sadrži 1 % D(+) glukoze (monohidrata). Sterilizirajte u autoklavu na 115 °C 20 minuta.

Agar s dodatkom kvasca, peptona i glukoze (YPGA)

Difco bacto ekstrakt kvasca (br. 0 127)	5 g
Difco bacto pepton (br. 0 118)	5 g
D(+)-glukoza (monohidrat)	10 g
Difco bacto pročišćeni agar (br. 0 560)	15 g
Destilirana voda	1 litra

Sterilizirajte 0,5 litre volumena hranjive podloge u autoklavu na 115 °C 20 minuta.

Podloga s dodatkom ekstrakta kvasca i mineralnih soli (YGM)

Difco bacto ekstrakt kvasca	2,0 g
D(+)-glukoza (monohidrat)	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
Difco bacto pročišćeni agar	18 g
Destilirana voda	1 litra

Sterilizirajte 0,5 litre volumena hranjive podloge u autoklavu na 115 °C 20 minuta.

Dodatak 7.

NUTRICIONI I FIZIOLOŠKI TESTOVI ZA IDENTIFIKACIJU *C. SEPEDONICUMA*

Sve se hranjive podloge trebaju inkubirati na 21 °C i pregledati nakon šest dana. Ako ne dođe do rasta, inkubirajte do 20 dana.

— **Oksidativni i fermentativni test** (Hugh & Leifson, 1953.) - O/F-test.

Osnovna podloga:

KCl	0,2 g
$MgSO_4$. $7H_2O$	0,2 g
$NH_4H_2PO_4$	1,0 g
Difco bacto pepton	1,0 g
Difco bacto pročišćeni agar	3,0 g
D(+)-glukoza (monohidrat)	10,0 g
Bromotimol plavi	0,03 g
Destilirana voda	1 litra

Promiješajte i namjestite na pH 7,0 do 7,2 s 1N KOH.

Dozirajte u Pyrex epruvete za kulturu 16 mm × 100 mm (kapaciteta 12 ml) u volumenima od 5 ml i 10 ml.

Sterilizirajte u autoklavu na 115 °C 10 minuta.

Inokulirajte ubodom epruvete od 5 ml i 10 ml za svaku kulturu. Aseptično dodajte 1 do 2 ml sterilnog tekućeg parafina u epruvetu od 10 ml. Inkubirajte.

Pozitivna reakcija:

Epruveta	Boja	Tumačenje
Otvorena	Žuta	Fermentativna
Zatvorena	Žuta	
Otvorena	Žuta	Oksidativna
Zatvorena	Plavozelena	
Otvorena	Zelenkasta	Oksidativna ili inertna
Zatvorena	Plavozelena	

— **Test oksidaze** (Kovacs, 1956.)

Kovacsev reagens oksidaze:

1 % vodenaste otopine tetrametil parafenilenediamin dihidroklorida (BDH br. 30386) u destiliranoj vodi.

Ovaj se reagens treba svježe napraviti u volumenima od 1 ml ili se može pohraniti u smeđoj staklenoj boci na 5 °C od 1 do 4 tjedna.

Stavite kap reagensa na filtar-papir u čistoj Petrijevoj zdjelici. Odmah istrljajte dio testirane kulture iz hranjivog agara koristeći platinastu petlju.

Pozitivna reakcija: razvoj ljubičaste boje unutar 10 sekundi. Kulture s vremenom od 10 do 30 sekundi su slabo pozitivne.

NB: Osnovno je upotrijebiti platinastu petlju i kulture NA, s obzirom da tragovi željeza ili visoki sadržaj šećera na vegetacijskoj podlozi mogu dati lažne pozitivne rezultate.

— **Proizvodnja kiselina iz laktoze, ramnoze, salicina, glicerola**

Pripremite Hugh & Leifsonovu O/F podlogu bez glukoze. Raspodijelite na volumene od 5 ml u epruvete. Sterilizirajte u autoklavu na 115 °C 10 minuta. Otopljenoj bazi na 45 °C aseptično dodajte 0,5 ml filtrom steriliziranih 10 % vodenastih otopina bilo glicerola ili laktoze, ramnoze ili salicina. Pažljivo promiješajte.

Pozitivna reakcija: promjena boje od plavozelenog do žutog indicira stvaranje kiseline.

— **Test katalaze**

Stavite kap hidrogen peroksida (volumen 30) na čisto stakalce i napravite emulziju s prstenom punim kulture koristeći platinasti prsten.

Pozitivna reakcija: proizvodnja mjehurića kisika u kapljici ukazuje na prisutnost katalaze.

— **Aktivnost reduktaze nitrata i denitrifikacija** (Bradbury, 1970.)

Podloga kulture:

KNO_3 (bez nitrita)	1 g
Difco bacto ekstrakt kvasca	1 g
K_2HPO_4	5 g
Destilirana voda	1 litra

Dozirajte u volumene od 10 ml u bočice od 20 ml. Sterilizirajte u autoklavu na 121 °C 15 minuta.

Reagens A:

H_2SO_4	8 g
5N octena kiselina	1 litra

Reagens B:

naftilamin	5 g
5N octena kiselina	1 litra

Inokulirajte nitratnu podlogu u duplikatu. Testirajte nakon 10 i 20 dana, dodavanjem jedne kapi Lugolove otopine, 0,5 ml reagensa A i 0,5 ml reagensa B. Ako podloga ne postane crvenkasta, dodajte približno 50 mg praška cinka. Promatrajte reakciju boje.

Pozitivna reakcija:	*Reakcija boje*	
	Stadij 1	Stadij 2
Nema redukcije nitrata	bezbojno	crveno
Redukcija nitrata sve do nitrita (samo reduktoza nitrata)	crveno	—
Redukcija nitrata iza nitrita (denitrifikacija – reduktaza nitrata i nitrita)	bezbojno	bezbojno

— **Stvaranje ureaze** (Lelliott, 1966.)

Osnovna podloga:

Oxoid urea agar (CM53)	2,4 g
Destilirana voda	95 ml

Sterilizirajte u autoklavu na 115 °C 20 minuta. Ohladite otopljenu bazu na 50 °C i antiseptički dodajte 5 ml filterom-sterilizirane 40 % vodenaste urea otopine (Oxoid SR20). Dobro promiješajte.

Raspodijelite na volumene od 6 ml u sterilne epruvete (16 × 100 mm) i neka budu koso položene s dobrom potporom.

Pozitivna reakcija: žuto-narančasta podloga razvija trešnja crvenu ili magenta ružičastu boju ako je došlo do aktivnosti ureaze.

Korištenje citrata (Christensen) (Skerman, 1967.)

agar s dodatkom citrata (Merck 2503)	23 g
Destilirana voda	1 litra

Promiješajte i otopite grijanjem. Dozirajte u volumene od 6 ml kao i za urea podlogu. Sterilizirajte u autoklavu na 121 °C 15 minuta i neka budu koso položene.

Pozitivna reakcija: korištenje citrata je naznačeno promjenom boje podloge iz narančaste u crvenu.

— **Stvaranje hidrogen sulfida** (Ramamurthi, 1959.)

Podloga:

Difco bacto tripton (br. 0123)	10 g
K_2HPO_4	1 g
NaCl	5 g
Destilirana voda	1 litra

Otopite i dozirajte u volumene od 6 ml u epruvete 16 × 100 mm. Sterilizirajte u autoklavu na 115 °C 10 minuta.

Inokulirajte i aseptički oduzmite olovo-acetat papir (Merck 9511) s ruba epruvete. Držite na miru s kapicom. Inkubirajte do 20 dana.

Pozitivna reakcija: stvaranje H_2S iz triptona je naznačeno razvojem crno-smeđe boje papira za testiranje.

— **Stvaranje indola** (Ramamurthi, 1959.)

Podloga:

Kao za H_2S test.

Uklonite olovo-acetat papir i dodajte 1 do 2 ml dietil etera i lagano protresite. Neka se slojevi odvoje (pet minuta) Pažljivo dodajte 0,5 ml Kovacsevog reagensa (Merck 9293) niz unutrašnjost nagnute epruvete.

Pozitivna reakcija: prisutnost indola je indicirana razvojem crvene boje u žutom sloju između etera i vodenastih frakcija.

— **Rast na 37 °C** (Ramamurthi, 1959.)

Podloga:

Difco bacto hranjivi bujon (br. 0003)	8 g
Destilirana voda	1 litra

Promiješajte, otopite i raspodijelite u volumene od 6 ml u epruvete.

Sterilizirajte u autoklavu na 121 °C 15 minuta.

Inokulirajte i inkubirajte na 37 °C.

Pozitivna reakcija: obratite pozornost na rast.

— **Rast u 7 % natrij-kloridu** (Ramamurthi, 1959.)

Podloga:

Difco bacto hranjivi bujon	8 g
NaCl	70 g
Destilirana voda	1 litra

Promiješajte, otopite i raspodijelite u volumene od 6 ml u epruvete.

Sterilizirajte u autoklavu na 121 °C 15 minuta.

Pozitivna reakcija: obratite pozornost na rast.

— **Hidroliza želatine** (Lelliott, Billing & Hayward, 1966.)

Podloga:

Difco bacto želatina (br. 0 143)	120 g
Destilirana voda	1 litra

Promiješajte, otopite zagrijavanjem i raspodijelite u volumene od 6 ml u epruvete.

Sterilizirajte u autoklavu na 121 °C 15 minuta.

Pozitivna reakcija: likvifakcija želatine čak i kad se drži na 5 °C 30 minuta.

— **Hidroliza škroba**

Podloga:

Difco bacto hranjivi agar (otopljen)	1 litra
Difco bacto topivi škrob (br. 0 178)	2 g

Promiješajte, sterilizirajte u autoklavu na 115 °C 10 minuta.

Natočite u plitice. Nasumce inokulirajte plitice.

Ako se kultura dobro razvila (od 10 do 20 dana), uklonite dio kulture i potopite Lugolovom otopinom.

Pozitivna reakcija: hidroliza škroba je indicirana čistim zonama ispod ili oko bakterijskog rasta; ostatak podloge oboji se ljubičasto.

— **Aktivnost hidrolaze eskulin** (Sneath & Collins, 1974.)

Podloga:

Difco bacto pepton	10 g
Eskulin	1 g
Željezni citrat (Merck 3862)	0,05 g
Natrij citrat	1 g
Destilirana voda	1 litra

Promiješajte da se otopi i raspodijelite u volumene od 6 ml u epruvete.

Sterilizirajte u autoklavu na 115 °C 10 minuta.

Podloga je čista, ali ima plavkastu fluorescenciju.

Pozitivna reakcija: hidroliza eskulina je indicirana razvojem smeđe boje zajedno s nestankom fluorescencije. To se može provjeriti uporabom ultraljubičaste lampe.

IZVORI

Bradbury, J. F., 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants (Izolarea și studiul preliminar al bacteriilor plantelor), Rev. Pl. Path., 49, 213-218.

Dinesen, I. G., 1984. The extraction and diagnosis of *Corynebacterium sepedonicum* from diseased potato tubers (Extragerea și diagnosticarea lui *Corynebacterium sepedonicum* la tuberculii de cartofi bolnavi), EPPO Bull., 14 (2), 147-152.

Doetsch, R. N., 1981. Determinative methods of light microscopy. In: Manual of methods for general bacteriology (Metode determinative de microscopie ușoară. În: Manualul metodelor de bacteriologie generală, Societatea americană de microbiologie), American Society for Microbiology, Washington, 21-23.

Hugh, R., and Leifson, F., 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria (Semnificația taxonomică a metabolismului fermentativ față de cel oxidativ al carbohidraților prin diverse bacterii gram-negative), J. Bact., 66, 24-26.

Janse, J. D., and Van Vaerenbergh, J., The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (*Corynebacterium sepedonicum*) in potato [Interpretarea metodei CE privind detectarea infecțiilor latente cu veștejirea bacteriană la cartof (*Corynebacterium sepedonicum*)]. EPPO Bull., 17, 1987, pp. 1-10.

Kovacs, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxydase reaction (Identificarea *Pseudomonas pyocianea* prin reacția de oxidază), Nature, Lond., 178, 703.

Lelliott, R. A., 1966. The plant pathogenic coryneform bacteria (Bacteriile corineforme patogene la plante), J. appl. Bact., 29, 114-118.

Lelliott, R. A., Billing, E., and Hayward, A. C., 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads (Un protocol determinativ pentru pseudomonadele patogene fluorescente ale plantelor), J. appl. Bact., 29, 470-489.

Lelliott, R. A. and Sellar, P.W., 1976. The detection of latent ring rot (*Corynebacterium sepedonicum* (Spiek. et Kotth.) Skapt. et Burkh.) in potato stocks [Detectarea veștejirii bacteriene latente (*Corynebacterium sepedonicum*) la stocurile de cartofi], EPPO Bull., 6 (2), 101-106.

Ramamurthi, C. S., 1959. Comparative studies on some Gram-positive phytopathogenic bacteria and their relationship to the Corynerbacteria (Studii comparative privind anumite bacterii fitopatogene gram-pozitive și relația lor cu bacteriile corineforme), Mem. Cornell agric. Exp. Sta., 366, 52 pp.

Sherman, V. B. D., 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria (Un ghid pentru identificarea speciilor de bacterii), Ediția a doua, William and Wilkins Company, Baltimore.

Sneath, P. H. A. and Collins, V.G., 1974. A study in test reproductibility between laboratories: report of *Pseudomonas* working party (Un studiu al reproductibilității între laboratoare: raportul grupurilor de lucru *Pseudomonas*), Antonie van Leeuwenhoek, 40, 481–527.

PRILOG II.

1. Kod svake sumnjive pojave za koju je utvrđen pozitivan test imunofluorescencije sukladno metodi iznesenoj u Prilogu I., a očekuje se potvrda ili pobijanje završetkom spomenute metode, treba zadržati i prikladno čuvati:

   — sve gomolje ili biljke iz kojih su uzeti uzorci, kad god je to moguće, i

   — svaki preostali ekstrakt i dodatno pripremljena stakalca imunofluorescencije,

   sve do završetka spomenute metode.

2. U slučaju pozitivne potvrde organizma, treba zadržati i prikladno čuvati:

   — materijal naveden u stavku 1., i

   — uzorak materijala zaraženog patlidžana inokuliranog s ekstraktom gomolja ili biljke, i

   — izoliranu kulturu organizma,

   najmanje mjesec dana nakon postupka obavijesti prema članku 5. stavku 2.

PRILOG III.

1. Elementi koji se trebaju uzeti u obzir pri određivanju raspona moguće kontaminacije prema članku 5. stavku 1. točki (b) uključuju:

   — gomolje ili biljke posađene na mjestu proizvodnje označenom kao kontaminiranim prema članku 5. stavku 1. točki (a),

   — mjesto (mjesta) proizvodnje ili objekte koji imaju neku proizvodnu vezu s gomoljima ili biljkama označenim kao kontaminiranim prema članku 5. stavku 1. točki (a), uključujući onu zajedničku opremu i objekte za proizvodnju izravno ili putem zajedničkog ugovaratelja,

   — gomolje i biljke proizvedene na mjestu (mjestima) proizvodnje iz prethodne alineje ili prisutnim na takvom mjestu (mjestima) proizvodnje tijekom razdoblja u kojem su gomolji ili biljke označeni kao kontaminirani prema članku 5. stavku 1. točki (a) bili prisutni u objektima ili mjestima proizvodnje spomenutim u prvoj alineji,

   — centralna skladišta koja rukuju krumpirima iz gore navedenih mjesta proizvodnje,

   — sve strojeve, vozilo, posudu, skladište ili jedinice istih te sve druge predmete, uključujući pakovine koje su mogle doći u kontakt s gomoljima ili biljkama označenim kao kontaminirani prema članku 5. stavku 1. točki (a), tijekom prethodnih 12 mjeseci ili prema potrebi,

   — sve gomolje ili biljke uskladištene u bilo kojoj od struktura ili predmeta iz prethodne alineje, ili su u kontaktu s njima, prije čišćenja i dezinfekcije tih struktura i objekata, i

   — uključuju kao rezultat testiranja prema članku 6., gomolje i biljke s istim klonskim podrijetlom kao i gomolji i biljke označeni kao kontaminirani prema članku 5. stavku 1. točki (a) i za koje ispitivanja ukazuju na to da je kontaminacija vjerojatna.

2. Elementi koji se trebaju uzeti u obzir pri određivanju mogućeg širenja prema članku 5. stavku 1. točki (c) uključuju:

   — blizinu drugih mjesta proizvodnje vegetacijskog krumpira ili drugih postrojenja domaćina,

   — zajedničke zalihe sjemenskog krumpira.

3. Detalji obavijesti navedene u prvom podstavku članka 5. stavka 2. uključuju:

   — za svaku isporuku krumpira ili količinu označenu kao kontaminiranu, certifikate predviđene u člancima 7. ili 8. Direktive 77/93/EEZ, putnu ispravu ili registarski broj, prema potrebi,

   — ime varijeteta zaliha sjemenskog krumpira i, gdje god je to moguće, u svim drugim slučajevima,

   — opis elemenata označene kontaminacije i omeđivanja zone,

   — dostupnost ekstrakta, pripremljenih stakalca za imunofluorescenciju, zaraženog materijala patlidžana i izolirane kulture organizma iz testa u kojem je izvršena pozitivna potvrda organizma.

PRILOG IV.

1. Službeno nadzirane mjere navedene u članku 7. stavku 1. za odlaganje gomolja ili biljaka označenih kao kontaminirani prema članku 5. stavku 1. točki (a) su:

— uporaba za industrijsku preradu putem izravne i trenutne isporuke prerađivačkim postrojenjima s prikladnim objektima za odlaganje otpada za koje je utvrđeno da nema ustanovljenog rizika od širenja organizma i sa sustavom dezinfekcije skladišnih područja i otpremnih vozila, ili

— druge mjere, pod uvjetom da je utvrđeno da nema ustanovljenog rizika od širenja organizma; o tim mjerama treba izvijestiti Komisiju i druge države članice.

2. Prikladna uporaba ili odlaganje gomolja ili biljaka određenih kao vjerojatno kontaminiranih prema članku 5. stavku 1. točki (b) i navedenih u članku 7. stavku 2. pod kontrolom odgovornih službenih tijela država članica je:

— uporaba tržišnog krumpira namijenjenog za potrošnju, zapakiranog za izravnu isporuku i uporabu bez prepakiravanja i namijenjenog za takvu izravnu isporuku ili uporabu, ili

— uporaba tržišnog krumpira namijenjenog za industrijsku preradu i namijenjenog za izravnu i trenutnu isporuku prerađivačkom postrojenju s prikladnim objektima za odlaganje otpada i dezinfekciju, ili

— neka druga uporaba ili odlaganje, pod uvjetom da je utvrđeno da nema ustanovljenog rizika od širenja organizma.

3. Prikladne metode za čišćenje i dezinfekciju objekata iz članka 7. stavka 3. su one za koje je utvrđeno da nema ustanovljenog rizika od širenja organizma i primjenjuju se pod nadzorom odgovornih službenih tijela država članica.

4. Niz mjera koje države članice primjenjuju unutar omeđene zone utvrđenih u skladu s člankom 5. stavkom 1. točkom (c) i navedenih u članku 7. stavku 4. uključuju:

4.1. na mjestima proizvodnje označenim kao kontaminiranim prema članku 5. stavku 1. točki (a):

(a) na polju označenom kao kontaminirano prema članku 5. stavku 1. točki (a) bilo:

i. — tijekom najmanje tri vegetacijske godine nakon godine označene kontaminacije,

— provode se mjere kojima se uklanjaju samonikle biljke krumpira i druge biljke domaćini organizma pronađene prirodno, i

— gomolji krumpira, biljke ili pravo sjeme, ili druge biljke domaćini organizma pronađene prirodno ili usjevi za koje postoji ustanovljeni rizik od preživljavanja ili širenja organizma, ne sade se sve dok se polje ne oslobodi samoniklih biljaka krumpira najmanje dvije uzastopne vegetacijske godine,

— u prvoj uzgojnoj sezoni krumpira nakon razdoblja navedenog u prethodnoj alineji, službeno certificirani sjemenski krumpir sadi se samo za tržišnu proizvodnju i provodi se službeno istraživanje, kako je navedeno u članku 2. stavku 1.;

— u uzgojnoj sezoni krumpira koja slijedi nakon one navedene u prethodnoj alineji i slijedom prikladnog rotacijskog ciklusa, službeno certificirani sjemenski krumpir sadi se bilo za sjemensku ili tržišnu proizvodnju i službeno istraživanje, kako je navedeno u članku 2. stavku 1. stavak 1. se provodi; ili

ii. — tijekom četiri vegetacijske godine nakon godine označene kontaminacije,

— provode se mjere kojima se uklanjaju samonikle biljke krumpira i druge biljke domaćini organizma pronađene prirodno, i

— polje se ostavlja, ili održava, bilo kao pusti ugar ili trajni pašnjak s čestom kratkom košnjom i intenzivnom ispašom,

— u prvoj uzgojnoj sezoni krumpira nakon razdoblja navedenog u prethodnoj alineji, službeno certificirani sjemenski krumpir sadi se samo za sjemensku ili tržišnu proizvodnju i provodi se službeno istraživanje, kako je navedeno u članku 2. stavku 1.;

(b) na drugim poljima:

— u vegetacijskoj godini nakon označene kontaminacije:

— ili se gomolji krumpira, biljke ili pravo sjeme, ili druge biljke domaćini organizma pronađene prirodno ne sade, ili se provode mjere kojima se uklanjaju samonikle biljke krumpira prema potrebi, ili

— se službeno certificirani sjemenski krumpir sadi samo za tržišnu proizvodnju, pod uvjetom da su odgovorna službena tijela zadovoljna da je uklonjen rizik od samoniklih biljaka krumpira i drugih biljaka domaćina organizma pronađenih prirodno,

— najmanje dvije vegetacijske godine nakon razdoblja navedenog u prethodnoj alineji, sadi se samo službeno certificirani sjemenski krumpir bilo za sjemensku ili tržišnu proizvodnju,

— u svakoj od vegetacijskih godina navedenih u prethodnoj alineji, provode se mjere kojima se uklanjaju samonikle biljke krumpira i druge biljke domaćini organizma pronađene prirodno i provodi se službeno istraživanje, kako je opisano u članku 2. stavku 1.,

— tamo gdje se službeno certificirani sjemenski krumpir sadi za tržišnu proizvodnju u vegetacijskoj godini nakon označene kontaminacije, vrši se inspekcija vegetacijskog usjeva u prikladno vrijeme i samonikle biljke krumpira se testiraju na organizam;

(c) odmah nakon označavanja kontaminacije prema članku 5. stavku 1. točki (a) i u svakoj narednoj vegetacijskoj godini sve do i uključujući prvu dopuštenu uzgojnu sezonu krumpira na polju (poljima) označenom kao kontaminiranim, kako je navedeno u točki (a), svi strojevi i skladišni prostori na mjestu proizvodnje i uključeni u proizvodnju krumpira se čiste i dezinficiraju prema potrebi i korištenjem prikladnih metoda, kako je navedeno u stavku 3.;

(d) u onim proizvodnim sustavima gdje je moguća potpuna zamjena vegetacijske podloge,

— ne sade se gomolji, biljke ili pravo sjeme sve dok proizvodna jedinica nije podvrgnuta službeno nadziranim mjerama za uklanjanje organizma i uklanjanje svakog krumpira ili drugog materijala iz roda Solanum, uključujući, barem, potpunu promjenu u vegetacijskoj podlozi te čišćenje i dezinfekciju proizvodne jedinice i sve opreme te je, slijedom toga, dobiveno odobrenje za proizvodnju krumpira od strane odgovornih službenih tijela, i

— proizvodnja krumpira vrši se iz službeno certificiranog sjemenskog krumpira ili iz mini-gomolja ili mikro-biljaka koje potječu iz testiranih izvora;

4.2. unutar omeđene zone, bez utjecaja na mjere navedene prema podstavku 4.1, države članice:

(a) odmah i tijekom najmanje tri vegetacijske godine nakon označene kontaminacije:

— osiguravaju nadzor od strane svojih odgovornih službenih tijela objekata koji uzgajaju, skladište ili rukuju gomoljima krumpira, zajedno s objektima u kojima se upravlja strojevima za krumpir pod ugovorom,

— zahtijevaju čišćenje i dezinfekciju strojeva i skladišta na tim objektima, prema potrebi i korištenje prikladnih metoda, kako je navedeno u 3.

— zahtijevaju sadnju samo certificiranog sjemena za sve usjeve krumpira unutar te zone,

— zahtijevaju odvojeno postupanje s pobranim zalihama sjemena i onima za tržište na svim objektima unutar zone,

— provode službeno istraživanje kako je navedeno u članku 2. stavku 1.;

(b) prema potrebi osnivaju program za zamjenu svih zaliha sjemenskog krumpira tijekom prikladnog vremenskog razdoblja.

O mjerama koje se provode sukladno 4.2., zajedno s registracijskim brojevima proizvođača, zbirnim skladištima i otpremnim centrima unutar omeđene zone, godišnje se obavješćuju druge države članice i Komisija.