KOMISIJAS DIREKTĪVA 2006/63/EK

(2006. gada 14. jūlijs),

ar ko groza II līdz VII pielikumu Padomes Direktīvā 98/57/EK par *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* apkarošanu

EIROPAS KOPIENU KOMISIJA,

ņemot vērā Eiropas Kopienas dibināšanas līgumu,

ņemot vērā Padomes 1998. gada 20. jūlija Direktīvu 98/57/EK [1] par *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al*. apkarošanu, un jo īpaši tās 11. pantu,

tā kā:

(1) Viens no kartupeļiem un tomātiem kaitīgajiem organismiem ir *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al*., kas ir kartupeļu tumšās gredzenpuves un kartupeļu un tomātu bakteriālās vītes izraisītājs (še turpmāk "organisms").

(2) Šis organisms joprojām ir sastopams dažās Kopienas teritorijās.

(3) Ar Direktīvu 98/57/EK ir pieņemti sīki izstrādāti pasākumi, kas dalībvalstīm jāpieņem cīņā pret organismu, lai noteiktu tā atrašanās vietu un izplatību; nepieļautu tā parādīšanos un izplatīšanos; un lai, konstatējot šo organismu, nepieļautu tā izplatīšanos un apkarotu to vai izskaustu pavisam.

(4) Kopš direktīvas pieņemšanas organisma bioloģijas, noteikšanas un identifikācijas procedūru izpratne ir būtiski attīstījusies. Turklāt praktiskā pieredze, kas gūta, kontrolējot organismu, rada nepieciešamību pārskatīt dažus ar kontroles pasākumiem saistītus tehniskos noteikumus.

(5) Pateicoties šīm izmaiņām, ir nepieciešams pārskatīt un atjaunināt pasākumus, kas iekļauti dažos Direktīvas 98/57/EK pielikumos.

(6) Noteikšanas un identifikācijas procedūrās iekļautas nesen izstrādātas noteikšanas metodes, piemēram, *in situ* fluorescences hibridizācija (*FISH*). Tāpat ir iekļauti polimerāzes ķēdes reakcijas (*PCR*) metodes uzlabojumi, pašreizējo noteikšanas un identifikācijas procedūru dažādu tehnisko elementu uzlabojumi, un metodes organisma noteikšanai un identifikācijai citos saimniekaugos, izņemot kartupeļus, kā arī noteikšanai ūdenī un augsnē

(7) Attiecībā uz kontroles pasākumu tehniskajiem elementiem, pilnveidoti noteikumi, kas attiecas uz pārbaudīto paraugu konservācijas veidu, lai saglabātu organisma izsekojamību, elementiem, kas nepieciešami, lai noteiktu potenciālās inficēšanās pakāpi, detalizētu informāciju par ikvienu apstiprinātu organisma klātbūtnes gadījumu un attiecīgo inficēto teritoriju, pasākumiem, ko īsteno paredzētajās ražošanas vietās, kuras uzskata par inficētām, un norobežotās teritorijās. Bez tam, pielikumos ir iekļauti daži noteikumi attiecībā uz tomātiem, lai pienācīgi ņemtu vērā šā auga kā organisma saimniekauga nozīmi.

(8) Šajā direktīvā paredzētie pasākumi ir saskaņā ar Pastāvīgās augu veselības komitejas atzinumu,

IR PIEŅĒMUSI ŠO DIREKTĪVU.

1. pants

Ar šo Direktīvas 98/57/EK II līdz VII pielikumu aizstāj ar atbilstošajiem tekstiem šīs direktīvas pielikumā.

2. pants

1. Dalībvalstis vēlākais līdz 2007. gada 31. martam pieņem un publicē normatīvos un administratīvos aktus, kas vajadzīgi, lai izpildītu šīs direktīvas prasības. Dalībvalstis nekavējoties iepazīstina Komisiju ar šo tiesību aktu tekstu un šo tiesību aktu un direktīvas atbilstības tabulu.

Dalībvalstis piemēro šos tiesību aktus no 2007. gada 1. aprīļa.

Dalībvalstis, pieņemot šos tiesību aktus, tajos ietver atsauci uz šo direktīvu, vai arī šādu atsauci pievieno to oficiālai publikācijai. Dalībvalstis nosaka, kā izdarāma šāda atsauce.

[1] OV L 235, 21.8.1998., 1. lpp.

2. Dalībvalstis tūlīt dara Komisijai zināmus savu tiesību aktu galvenos noteikumus, ko tās pieņem jomā, uz kuru attiecas šī direktīva.

3. pants

Šī direktīva stājas spēkā trešajā dienā pēc tās publicēšanas *Eiropas Savienības Oficiālajā Vēstnesī*.

4. pants

Šī direktīva ir adresēta dalībvalstīm.

Briselē, 2006. gada 14. jūlijā

Komisijas vārdā –
Komisijas loceklis
Markos KYPRIANOU

PIELIKUMS

"II PIELIKUMS

TESTĒŠANAS SHĒMA *RALSTONIA SOLANACEARUM* (SMITH) YABUUCHI *ET AL.* DIAGNOSTICĒŠANAI, NOTEIKŠANAI UN IDENTIFICĒŠANAI

TESTĒŠANAS SHĒMAS DARBĪBAS JOMA

Šajā shēmā aprakstītas dažādas procedūras, kas saistītas ar:

i) kartupeļu tumšās gredzenpuves diagnosticēšanu kartupeļu bumbuļos un bakteriālās vītes diagnosticēšanu kartupeļu, tomātu u. c. saimniekaugos;

ii) *Ralstonia solanacearum* noteikšanu kartupeļu bumbuļu, kartupeļu, tomātu u.c. saimniekaugu, paraugos, kā arī ūdenī un augsnē;

iii) *Ralstonia solanacearum (R. solanacearum)* identifikāciju.

SATURS

Lpp.

Vispārīgi principi 40

I IEDAĻA: Testēšanas shēmas piemērošana 40

1. Kartupeļu tumšās gredzenpuves un bakteriālās vītes (*R. solanacearum*) diagnosticēšanas shēma kartupeļu bumbuļos un augos, tomātu u.c. saimniekaugos ar tumšās gredzenpuves vai bakteriālās vītes simptomiem 40

2. *R. solanacearum* noteikšanas un identifikācijas shēma asimptomātiskos kartupeļu bumbuļu paraugos 43

3. *R. solanacearum* noteikšanas un identifikācijas shēma asimptomātiskos kartupeļu, tomātu vai citos saimniekaugos 46

II IEDAĻA: Metodes *R. solanacearum* diagnosticēšanai kartupeļu bumbuļos un kartupeļu, tomātu u.c. saimniekaugos, ar tumšās gredzenpuves vai bakteriālās vītes simptomiem 48

1. Simptomi 48

2. Ātrie skrīninga testi 48

3. Izolēšanas procedūra 49

4. *R. solanacearum* identifikācijas testi 49

III IEDAĻA: 1. *R. solanacearum* noteikšanas un identifikācijas metodes asimptomātiskos kartupeļu bumbuļu paraugos 49

1.1. Paraugu sagatavošana 49

1.2. Testēšana 51

2. *R. solanacearum* noteikšana un identifikācija asimptomātiskos kartupeļu, tomātu u. c. saimniekaugu paraugos 51

2.1. Paraugu sagatavošana 51

2.2. Testēšana 52

IV IEDAĻA: 1. Shēma *R. solanacearum* noteikšanai un identifikācijai ūdenī 53

2. Metodes *R. solanacearum* noteikšanai un identifikācijai ūdenī 55

2.1. Paraugu sagatavošana 55

2.2. Testēšana 55

V IEDAĻA: 1. Shēma *R. solanacearum* noteikšanai un identifikācijai augsnē 56

2. Metodes *R. solanacearum* noteikšanai un identifikācijai augsnē 58

2.1. Paraugu sagatavošana 58

2.2. Testēšana 58

Lpp.

VI IEDAĻA: Optimizētie protokoli *R. solanacearum* noteikšanai un identifikācijai 58

A. Diagnostikas un noteikšanas testi 58

1. Stublāju eksudāta tests 58

2. Poli-β-hidroksibutirāta granulu noteikšana 58

3. Seroloģiskie aglutinācijas testi 59

4. Selektīvā izolācija 60

4.1. Selektīvie uzsējumi 60

4.2. Bagātināšanas procedūra 60

5. Imunofluorescences tests (*IF* tests) 61

6. Polimerāzes ķēdes reakcijas tests (*PCR* tests) 64

6.1. DNS attīrīšanas metodes 65

a) *Pastrik* (2000) metode 65

b) Citas metodes 65

6.2. PCR 66

6.3. PCR produkta analīze 66

7. *In situ* fluorescences hibridizācija (*FISH* tests) 67

8. Cietfāzes enzīmu imūnsorbences tests (*ELISA* tests) 69

a) Netiešā *ELISA* 69

b) Netiešās divslāņu antivielu cietfāzes enzīmu imūnsorbences tests (*DASI ELISA*) 70

9. Biopatogenitātes tests 71

B. Identifikācijas testi 72

1. Barības vielu un fermentu identifikācijas tests 72

2. *IF* tests 72

3. *ELISA* tests 73

4. *PCR* tests 73

5. *FISH* tests 73

6. Taukskābju sastāva profilēšana (*FAP*) 73

7. Celma raksturojuma metodes 73

7.1. Bioloģiskā varianta noteikšana 73

7.2. Genoma nospiedums 74

7.3. *PCR* metodes 74

C. Apstiprinājuma tests 74

1. papildinājums Laboratorijas, kas piedalās protokolu optimizācijas un validācijas procesā . 76

2. papildinājums Barotne *R. solanacearum* izolācijai un audzēšanai 77

3. papildinājums A) Tirdzniecībā pieejamie standartizētie kontroles materiāli 79

B) Kontrolparaugu sagatavošana 80

4. papildinājums Buferšķīdumi testu procedūrām 82

5. papildinājums Inficēšanās līmeņa noteikšana ar *IF* un *FISH* testiem 85

6. papildinājums Validēts *PCR* protokols un reaģenti 86

7. papildinājums Validētie reaģenti *FISH* testam 91

8. papildinājums Tomātu un baklažānu augu kultūra 93

Izmantotā literatūra 94

VISPĀRĪGI PRINCIPI

Papildinājumos iekļauti optimizētie protokoli dažādām metodēm, validētiem reaģentiem un sīkākām ziņām par testa sagatavošanu un kontroles materiāliem. To laboratoriju saraksts, kuras piedalās protokolu optimizācijas un validācijas procesā, noteikts 1. papildinājumā.

Tā kā protokoli paredz karantīnas organismu noteikšanu, un tajos paredzēta *R. solanacearum* dzīvotspējīgu kultūru izmantošana kontroles materiāla veidā, procedūra jāveic piemērotos karantīnas apstākļos ar atbilstošām atkritumu iznīcināšanas iekārtām un ievērojot attiecīgas licences noteikumus, kuru izsniegušas oficiālās augu karantīnas iestādes.

Testēšanas parametriem jānodrošina viendabīga un reproducējama *R. solanacearum* līmeņa noteikšana, ievērojot izvēlētajām metodēm paredzētos noteikšanas sliekšņus.

Pozitīvā kontrolparauga precīza sagatavošana ir obligāta.

Testēšana atbilstoši paredzētajiem noteikšanas sliekšņiem paredz arī iekārtu pareizu regulēšanu, uzturēšanu un kalibrēšanu, uzmanīgu rīkošanos ar reaģentiem, to glabāšanu un visus pasākumus, lai novērstu inficēšanos starp paraugiem, piemēram, pozitīvo kontrolparaugu nodalīšanu no testa paraugiem. Jāpiemēro kvalitātes kontroles standarti, lai izvairītos no administratīvām un cita veida kļūdām, jo īpaši attiecībā uz marķēšanu un dokumentēšanu.

Kā minēts 4. panta 2. punktā Direktīvā 98/57/EK, aizdomas par organisma parādīšanos paredz pozitīvu rezultātu diagnosticēšanas vai skrīninga testos, kas veikti saskaņā ar shēmām. Pozitīvu skrīninga testa rezultātu (*IF* tests, *PCR/FISH*, selektīvā izolācija) apstiprina ar otru skrīninga testu, kura pamatā ir atšķirīgs bioloģiskais princips.

Ja pirmā skrīninga testa rezultāts ir pozitīvs, tad ir aizdomas par inficēšanos ar *R. solanacearum*, un ir jāveic otrs skrīninga tests. Ja otrais skrīninga tests ir pozitīvs, tad aizdomas apstiprinās (aizdomas par organisma klātbūtni), un ir jāturpina testēšana atbilstoši shēmai. Ja otrā skrīninga testa rezultāts ir negatīvs, uzskata, ka paraugs nav inficēts ar *R. solanacearum*.

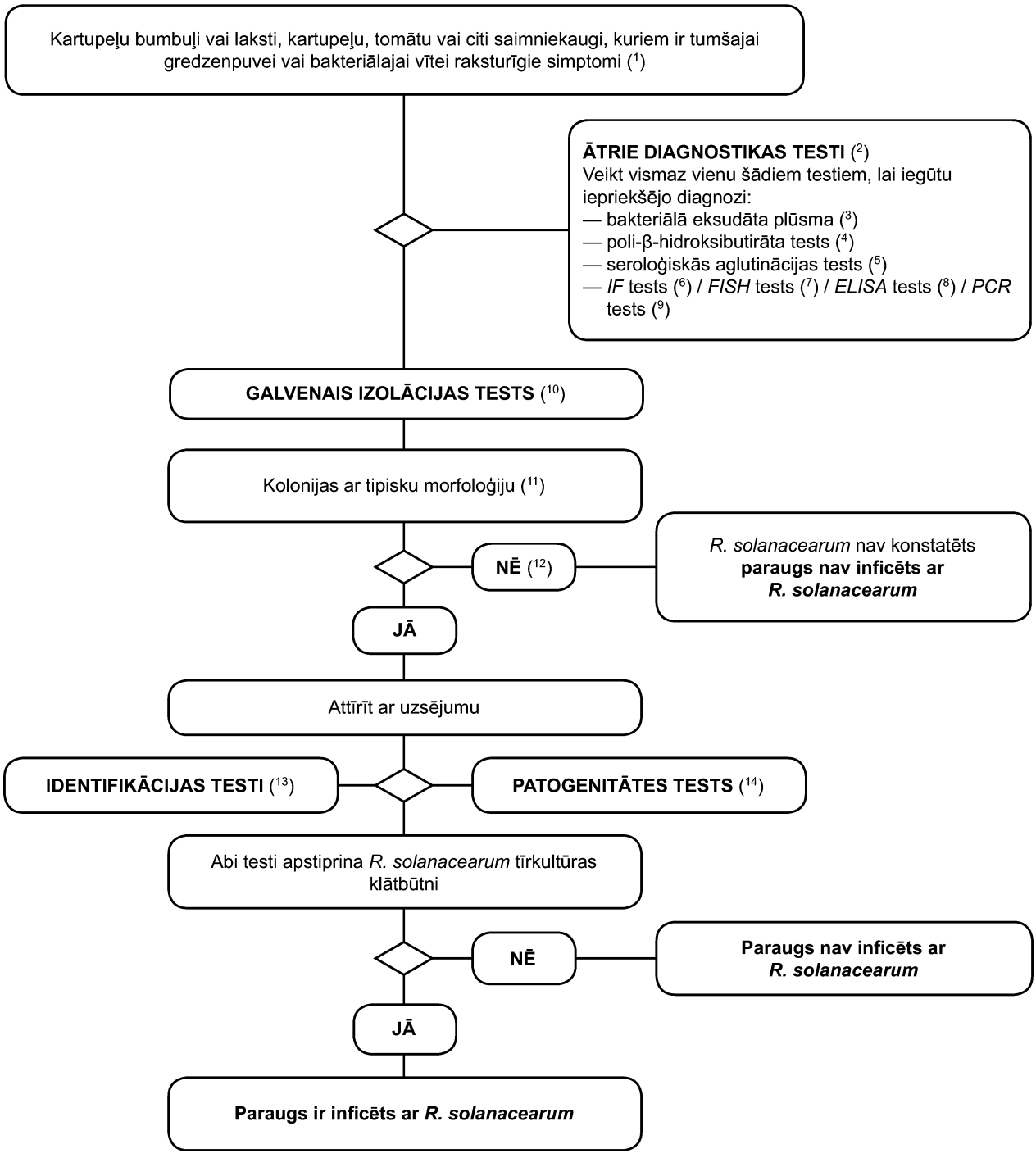
Saskaņā ar 5. panta 1. punktu Direktīvā 98/57/EK, apstiprināta klātbūtne nozīmē *R. solanacearum* tīrkultūras izolēšanu, identifikāciju un patogenitātes apstiprināšanu.

I IEDAĻA

TESTĒŠANAS SHĒMAS PIEMĒROŠANA

1. **Shēma kartupeļu tumšās gredzenpuves un bakteriālās vītes (*Ralstonia solanacearum*) diagnosticēšanai kartupeļu bumbuļos un kartupeļu, tomātu vai citos saimniekaugos, kuriem ir tumšās gredzenpuves vai bakteriālās vītes simptomi.**

   Testēšanas procedūra paredzēta kartupeļu bumbuļiem un lakstiem, kuriem ir tumšajai gredzenpuvei raksturīgi simptomi, vai attiecībā uz kuriem ir aizdomas par inficēšanos ar tumšo gredzenpuvi vai bakteriālo vīti. Tā ietver ātro skrīninga testu, patogēna izolēšanu no inficētajiem vadaudiem (selektīvajā) barotnē un, ja iegūts pozitīvs rezultāts, kultūras identificēšanu kā *Ralstonia solanacearum*.


Kartupeļu bumbuļi vai laksti, kartupeļu, tomātu vai citi saimniekaugi, kuriem ir tumšajai gredzenpuvei vai bakteriālajai vītei raksturīgie simptomi (1)
ĀTRIE DIAGNOSTIKAS TESTI (2)
Veikt vismaz vienu šādiem testiem, lai iegūtu iepriekšējo diagnozi:
— bakteriālā eksudāta plūsma (3)
— poli-β-hidroksibutirāta tests (4)
— seroloģiskās aglutinācijas tests (5)
— IF tests (6) / FISH tests (7) / ELISA tests (8) / PCR tests (9)
GALVENAIS IZOLĀCIJAS TESTS (10)
Kolonijas ar tipisku morfoloģiju (11)
NĒ (12)
R. solanacearum nav konstatēts
paraugs nav inficēts ar
R. solanacearum
JĀ
Attīrīt ar uzsējumu
IDENTIFIKĀCIJAS TESTI (13)
PATOGENITĀTES TESTS (14)
Abi testi apstiprina R. solanacearum tīrkultūras klātbūtni
NĒ
Paraugs nav inficēts ar
R. solanacearum
JĀ
Paraugs ir inficēts ar R. solanacearum

([1]) Simptomu aprakstu sk. II iedaļas 1. punktā.

([2]) Ātrie diagnostikas testi palīdz noteikt iespējamo diagnozi, taču tie nav obligāti. Negatīvs testa rezultāts ne vienmēr garantē to, ka patogēna nav.

([3]) Bakteriālās eksudāta plūsmas tests no vaskulārajiem stublāja audiem aprakstīts VI iedaļas A.1. punktā.

([4]) Poli-β-hidroksibutirāta granulu tests bakteriālajās šūnās aprakstīts VI iedaļas A.2. punktā.

([5]) Bakteriālā eksudāta vai simptomātisko audu ekstrakta seroloģiskās aglutinācijas testi aprakstīti VI iedaļas A.3. punktā.

([6]) Bakteriālā eksudāta ūdens suspensijas vai simptomātisko audu ekstrakta IF tests aprakstīts VI iedaļas A.5. punktā.

([7]) Bakteriālā eksudāta ūdens suspensijas vai simptomātisko audu ekstrakta FISH tests aprakstīts VI iedaļas A.7. punktā.

([8]) Bakteriālā eksudāta ūdens suspensijas vai simptomātisko audu ekstrakta ELISA tests aprakstīts VI iedaļas A.8. punktā.

([9]) Bakteriālā eksudāta ūdens suspensijas vai simptomātisko audu ekstrakta ELISA tests aprakstīts VI iedaļas A.8. punktā.

([10]) Patogēnu parasti var viegli izolēt no augu materiāla ar slimības pazīmēm, izmantojot atšķaidījumu uzsējumus (II iedaļas 3. punkts).

([11]) Koloniju tipiska morfoloģija ir aprakstīta II iedaļas 3.d punktā.

([12]) Uzsējums var neizdoties vēlīnajās slimības stadijās, jo to var izkonkurēt vai pāraugt saprofītās baktērijas. Ja izolēšanas testa rezultāts ir negatīvs, taču ir raksturīgās slimības pazīmes, tad izolēšana jāatkārto, vēlams, veicot selektīvo uzsējumu testu.

([13]) Ticamu *R. solanacearum* tīrkultūru iespējamo izolātu identifikāciju panāk, izmantojot testus, kas aprakstīti VI iedaļas B. punktā. Sīkāks raksturojums nav obligāts, taču ieteicams attiecībā uz katru jaunu gadījumu.

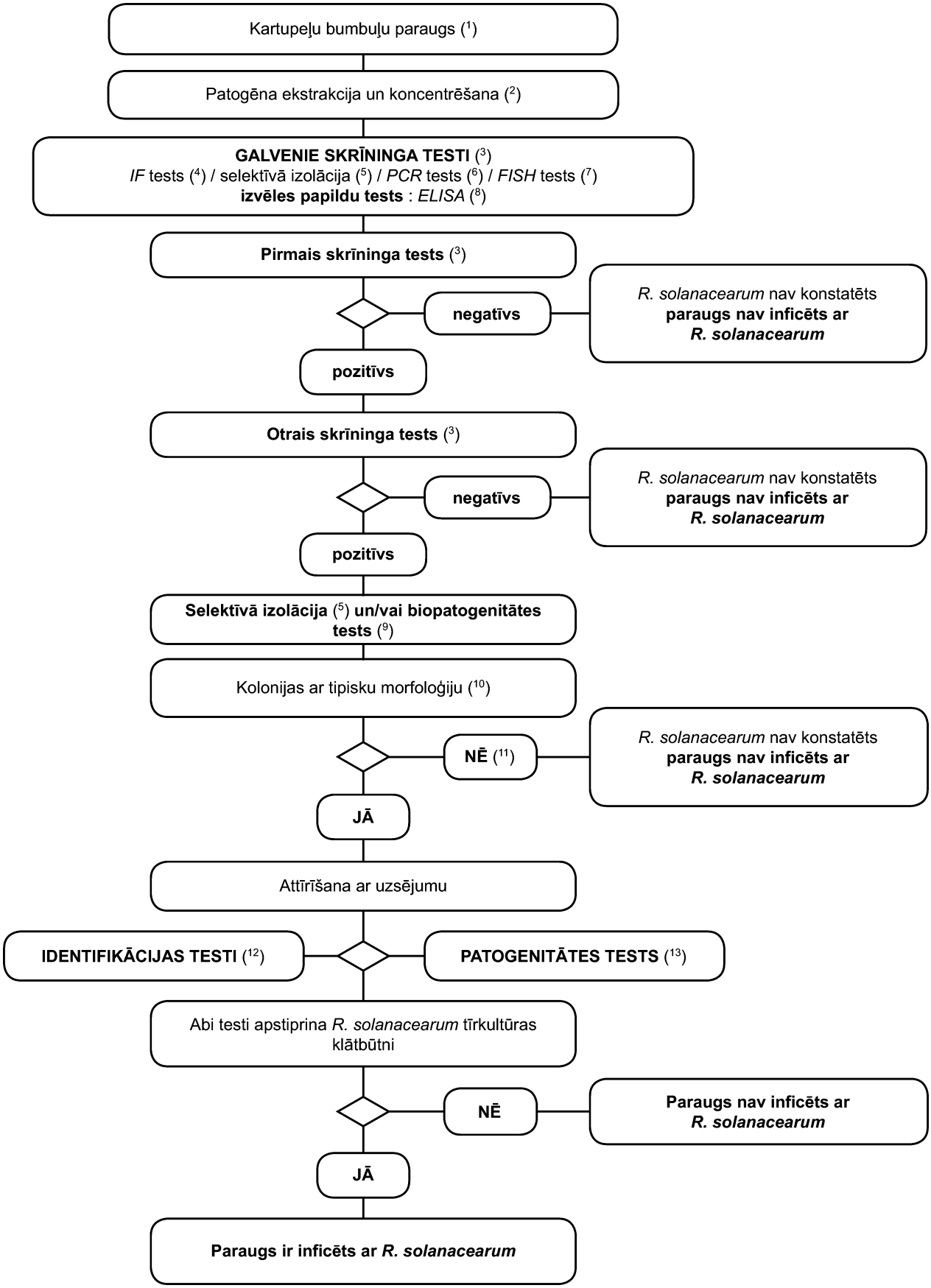
([14]) Patogenitātes tests ir aprakstīts VI iedaļas C. punktā.

2. ***Ralstonia solanacearum* noteikšanas un identifikācijas shēma asimptomātiskos kartupeļu bumbuļu paraugos**

Princips:

Testa procedūra paredzēta latentas inficēšanās noteikšanai kartupeļu bumbuļos. Vismaz divu skrīninga testu ([3]), kuri balstīti uz dažādiem bioloģiskajiem principiem, pozitīvs rezultāts ir jāapstiprina ar patogēna izolāciju; kam seko tipisku koloniju izolācijas gadījumā *R. solanacearum* tīrkultūras apstiprināšana. Tikai viena skrīninga testa pozitīvs iznākums nav pietiekams, lai uzskatītu, ka paraugs varētu būt inficēts.

Veicot skrīninga un izolācijas testus, jāparedz, ka var noteikt 10^3 līdz 10^4 šūnas uz 1 ml atkārtoti suspendēta ekstrakta koncentrāta, ko katrā testu sērijā iekļauj kā pozitīvo kontrolparaugu.


Kartupeļu bumbuļu paraugs (1)
Patogēna ekstrakcija un koncentrēšana (2)
GALVENIE SKRĪNINGA TESTI (3)
IF tests (4) / selektīvā izolācija (5) / PCR tests (6) / FISH tests (7)
izvēles papildu tests : ELISA (8)
Pirmais skrīninga tests (3)
negatīvs
R. solanacearum nav konstatēts
paraugs nav inficēts ar
R. solanacearum
pozitīvs
Otrais skrīninga tests (3)
negatīvs
R. solanacearum nav konstatēts
paraugs nav inficēts ar
R. solanacearum
pozitīvs
Selektīvā izolācija (5) un/vai biopatogenitātes tests (9)
Kolonijas ar tipisku morfoloģiju (10)
NĒ (11)
R. solanacearum nav konstatēts
paraugs nav inficēts ar
R. solanacearum
JĀ
Attīrīšana ar uzsējumu
IDENTIFIKĀCIJAS TESTI (12)
PATOGENITĀTES TESTS (13)
Abi testi apstiprina R. solanacearum tīrkultūras klātbūtni
NĒ
Paraugs nav inficēts ar
R. solanacearum
JĀ
Paraugs ir inficēts ar R. solanacearum

([1]) Parauga standarta izmērs ir 200 bumbuļi, bet procedūru var īstenot ar mazākiem paraugiem, ja 200 bumbuļi nav pieejami.

([2]) Patogēna ekstrakcijas un koncentrācijas metodes aprakstītas III iedaļas 1.1. punktā.

([3]) Ja vismaz divi testi, kas balstīti uz dažādiem bioloģiskajiem principiem, uzrāda pozitīvus rezultātus, veic izolācijas un apstiprināšanas pārbaudes. Veikt vismaz vienu skrīninga testu. Ja šā testa rezultāts ir negatīvs, uzskata, ka paraugs nav inficēts. Ja testa rezultāts ir pozitīvs, nepieciešams veikt otru skrīninga testu vai vairākus testus, kas balstīti uz citiem bioloģiskajiem principiem, lai pārbaudītu pirmo pozitīvo rezultātu. Ja otrā testa vai nākamo testu rezultāti ir negatīvi, uzskata, ka paraugs nav inficēts. Turpmāki testi nav nepieciešami.

([4]) *IF* tests aprakstīts VI iedaļas A.5. punktā.

([5]) Selektīvās izolācijas tests aprakstīts VI iedaļas A.4. punktā.

([6]) *PCR* tests aprakstīts VI iedaļas A.6. punktā.

([7]) *FISH* tests aprakstīts VI iedaļas A.7. punktā.

([8]) PCR tests aprakstīts VI iedaļas A.8. punktā.

([9]) Biopatogenitātes tests aprakstīts VI iedaļas A.9. punktā.

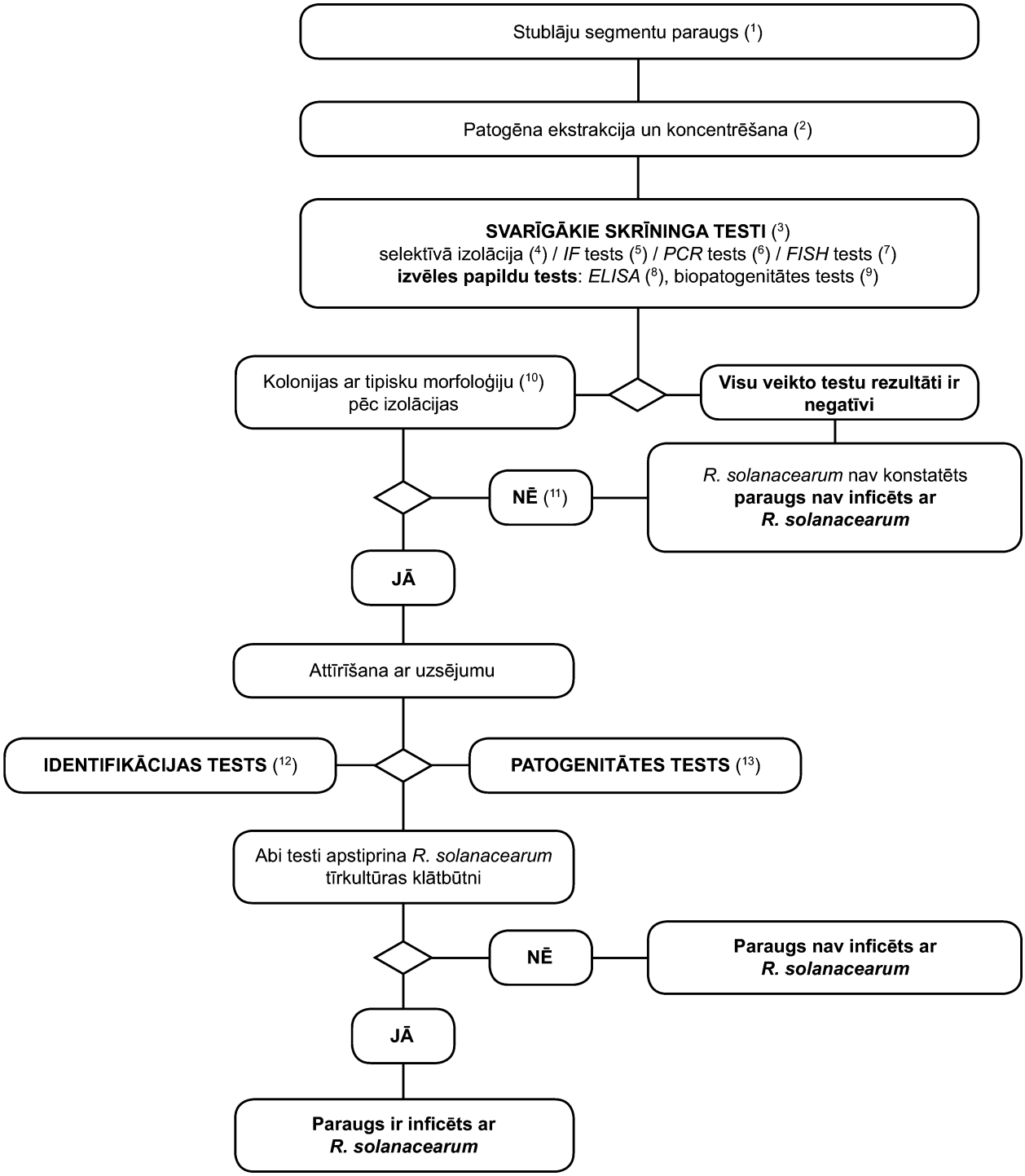
([10]) Kolonijas tipiska morfoloģija aprakstīta II iedaļas 3.d punktā.

([11]) Uzsējums vai biopatogenitātes tests var neizdoties, ja saprofītās baktērijas izkonkurē vai nomāc to. Ja skrīninga testi uzrāda pozitīvus rezultātus, bet izolācijas testu rezultāts ir negatīvs, tad izolācijas testi jāatkārto, ņemot paraugus no tā paša ekstrakta koncentrāta vai ņemot papildu vadaudus blakus sagriezta bumbuļa stolona pamatnei no tā paša parauga, un nepieciešamības gadījumā pārbaudot papildu paraugus.

([12]) Ticamu *R. solanacearum* tīrkultūru iespējamo izolātu identifikāciju panāk, izmantojot testus, kas aprakstīti VI iedaļas B. punktā.

([13]) Patogenitātes tests aprakstīts VI iedaļas C. punktā.

3. ***Ralstonia solanacearum*** **noteikšanas un identifikācijas shēma asimptomātiskos kartupeļu, tomātu vai citu saimniekaugu paraugos**



([1]) Ieteicamie paraugu izmēri norādīti III iedaļas 2.1. punktā.

([2]) Patogēna ekstrakcijas un koncentrācijas metodes aprakstītas III iedaļas 2.1. punktā.

([3]) Ja vismaz divi testi, kas balstīti uz dažādiem bioloģiskajiem principiem, uzrāda pozitīvus rezultātus, veic izolācijas un apstiprināšanas pārbaudes. Veikt vismaz vienu skrīninga testu. Ja šā testa rezultāts ir negatīvs, uzskata, ka paraugs nav inficēts. Ja testa rezultāts ir pozitīvs, nepieciešams veikt otru skrīninga testu vai vairākus testus, kas balstīti uz citiem bioloģiskajiem principiem, lai pārbaudītu pirmo pozitīvo rezultātu. Ja otrā testa vai nākamo testu rezultāti ir negatīvi, uzskata, ka paraugs nav inficēts. Turpmāki testi nav nepieciešami.

([4]) Selektīvās izolācijas tests aprakstīts VI iedaļas A.4. punktā.

([5]) *IF* tests aprakstīts VI iedaļas A.5. punktā.

([6]) PCR tests aprakstīts VI iedaļas A.6. punktā.

([7]) *FISH* tests aprakstīts VI iedaļas A.7. punktā.

([8]) *ELISA* tests aprakstīts VI iedaļas A.8. punktā.

([9]) Biopatogenitātes tests aprakstīts VI iedaļas A.9. punktā.

([10]) Kolonijas tipiska morfoloģija aprakstīta II iedaļas 3.d punktā.

([11]) Uzsējums vai biopatogenitātes tests var neizdoties, ja to izkonkurē vai nomāc saprofītās baktērijas. Ja skrīninga testu rezultāti ir pozitīvi, bet izolācijas testu rezultāti ir negatīvi, izolācijas testus atkārto.

([12]) Ticamu *R. solanacearum* tīrkultūru iespējamo izolātu identifikāciju panāk, izmantojot testus, kas aprakstīti VI iedaļas B. punktā.

([13]) Patogenitātes tests aprakstīts VI iedaļas C punktā.

II IEDAĻA

SĪKI IZKLĀSTĪTAS METODES *RALSTONIA SOLANACEARUM* NOTEIKŠANAI KARTUPEĻU BUMBUĻOS UN KARTUPEĻU, TOMĀTU VAI CITOS SAIMNIEKAUGOS, KURIEM IR TUMŠĀS GREDZENPUVES VAI BAKTERIĀLĀS VĪTES SIMPTOMI.

1. **Simptomi** (sk. http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main)

1.1. Simptomi kartupeļiem

Kartupeļu augi. Infekcijas agrīno fāzi uz lauka var konstatēt pēc tā, ka dienā, ja temperatūra ir augsta, auga galotnei apvīst lapas, bet naktī tās atgūst stingrumu. Infekcijas sākuma stadijā lapas saglabā zaļo krāsu, bet vēlāk kļūst dzeltenīgas vai brūnas, un atmirst. Parādās arī epinastija. Viena dzinuma vai visa auga vīšana ātri kļūst neatgriezeniska un izraisa pilnīgu auga bojāeju. Šķērsām pārgriežot novītušo augu stublājus, to vadaudi var nobrūnēt, un no griezuma vietas izdalās pienains bakteriālais šķidrums, vai tas viegli izdalās saspiežot. Ja nogrieztu stublāju vertikāli ievieto ūdenī, no vadaudu kūlīšiem izplūst gļotu pavedieni.

Kartupeļu bumbuļi. Kartupeļu bumbuļi jāpārgriež šķērsām netālu no to pamatnēm (stolona) vai gareniski pār stolona pamatni. Infekcijas agrīnajā fāzē vadaudu gredzens ir mainījis krāsu no blāvi dzeltenas līdz gaiši brūnai, no kura pēc dažām minūtēm pēkšņi izdalās blāvs krēmkrāsas bakteriālais šķidrums. Vēlāk vaskulārais gredzens kļūst arvien brūnāks un nekroze var pāriet uz parenhimatozajiem audiem. Vēlākajās fāzēs no bumbuļu pamatnēm un acīm izplatās infekcija, no tām var izdalīties bakteriālais šķidrums, izraisot augsnes daļiņu pielipšanu. Var rasties sarkanbrūni, nedaudz padziļināti bojājumi uz miziņas, kas rodas vaskulāro audu iekšējās sabrukšanas dēļ. Slimības vēlīnajām stadijām ir raksturīga sēnīšu vai baktēriju mīkstās puves otrreizējā attīstība.

1.2. Simptomi tomātiem

Tomātu augi. Pirmā redzamā pazīme ir šļaugana izskata jaunākās lapas. Patogēnam labvēlīgos attīstības apstākļos (augsnes temperatūra 25 °C; augsts mitrums) pāris dienu laikā attīstās vienas auga puses vai visa auga epinastija un vīte, kas rezultātā rada auga bojāeju. Ja apstākļi nav tik labvēlīgi (augsnes temperatūra zem 21 °C) vīte ir mazāk izteikta, bet uz stublāja var attīstīties liels daudzums papildsakņu. No stublāja pamatnes var novērot redzamas gļotainas līnijas, kas liecina par nekrozi vadaudu sistēmā. Ja stumbrs ir pārgriezts šķērsām, brūni iekrāsoti vadaudi izdala baltu vai dzeltenīgu bakteriālo šķidrumu.

1.3. Simptomi citiem saimniekaugiem

Solanum dulcamara un *S. nigrum augi*. Dabīgos apstākļos šajos nezāļu saimniekaugos reti novēro vītes simptomus, izņemot gadījumus, ja augsnes temperatūra pārsniedz 25 °C vai inokulāta līmeņi ir ārkārtīgi augsti (piemēram, attiecībā uz blakus inficētajam kartupeļu vai tomātu augam augošo *S. nigrum*). Ja parādās vīte, simptomi ir tādi paši kā attiecībā uz tomātiem. *S. dulcamara* augiem, kas ar stublāju un saknēm atrodas ūdenī, nav raksturīga vīte, bet šķērsenisko stublāja pamatnes daļu vai stublāja daļu, kas atrodas zem ūdens, vadaudi iekšpusē var kļūt gaiši brūni. Ja nogrieztu stublāju vertikāli ievieto ūdenī, no vadaudiem vai gļotu pavedieniem izplūst bakteriālais šķidrums arī tad, ja nav redzamu vītes simptomu.

2. **Ātrie skrīninga testi**

Ātrie skrīninga testi palīdz noteikt iespējamo diagnozi, taču tie nav obligāti. Izmantot vienu vai vairākus no šādiem apstiprinātiem testiem.

2.1. Stublāju eksudāta tests

(Sk. VI iedaļas A.1. punktu).

2.2. Poli-β-hidroksibutirāta (PHB) granulu noteikšana

Raksturīgās PHB granulas *R. solanacearum* šūnās kļūst redzamas pēc tam, kad bakteriālā šķidruma uztriepes no inficētajiem audiem, kas fiksētas ar liesmu, uz mikroskopa priekšmetstikliņa tiek iekrāsotas ar Nīlas zilo A vai Sudānas melno (sk. VI iedaļas A.2. punktu).

2.3. Seroloģiskie aglutinācijas testi

(Sk. VI iedaļas A.3. punktu)

2.4. Pārējie testi

Turpmāki atbilstoši ātrie skrīninga testi ietver *IF* testu (sk. VI iedaļas A.5. punktu), *FISH* testu (sk. VI iedaļas A.7. punktu); *ELISA* testu (sk. VI iedaļas A.8. punktu) un *PCR* testu (sk. VI iedaļas A.6. punktu).

3. **Izolēšanas procedūra**

a) No kartupeļu bumbuļa vadaudu gredzena vai no kartupeļa, tomāta vai cita vītes skarta saimniekauga stublāja vadaudu šķiedru pavedieniem noņemt izdalījušos šķidrumu vai krāsu mainījušos audus. Suspendēt nelielā daudzumā sterila destilēta ūdens vai 50 mM fosfātbuferšķīduma (4. papildinājums) un atstāt uz 5–10 min.

b) Sagatavot suspensijas decimālatšķaidījumu sēriju.

c) 50–100 µl suspensijas un atšķaidījumus pārnest universālajā barotnē (*NA*, *YPGA* vai *SPA*; sk. 2. papildinājumu) un/vai Kelmana tetrazola barotnē (2. papildinājums) un/vai validētā selektīvajā barotnē (piemēram, *SMSA*; sk. 2. papildinājumu). Uzklāt vai iztriept, izmantojot piemērotu atšķaidījuma uzsējuma metodi. Ja tas ir lietderīgi, sagatavot atsevišķas plates ar 2. bioloģiskā varianta *R. solanacearum* šūnu suspensijas atšķaidījumu uzsējumiem kā pozitīvo kontrolparaugu.

d) Inkubēt uzsējumus 2–6 dienas 28 °C temperatūrā.

— Universālā barotnē *R. solanacearum* virulentie izolāti veido pērļaini baltas, plakanas, neregulāras un šķidras konsistences kolonijas, kuru centrā bieži attīstās raksturīgi spirāles veida vijumi. *R. solanacearum* nevirulentās formas veido nelielas, apaļas, sviestveida konsistences kolonijas krēmbaltā krāsā;

— Kelmana tetrazola un SMSA barotnē spirāles veida vijumi ir asinssarkanā krāsā. *Ralstonia solanacearum* nevirulentās formas veido nelielas, apaļas, sviestveida konsistences kolonijas tumši sarkanā krāsā.

4. ***R. solanacearum* idenfikācijas testi**

Testi *R. solanacearum* iespējamo izolātu identitātes apstiprināšanai ir aprakstīti VI iedaļas B. punktā.

III IEDAĻA

1. **Sīki izstrādātas metodes *Ralstonia solanacearum* noteikšanai un identifikācijai asimptomātiskos kartupeļu bumbuļu paraugos**

1.1. Paraugu sagatavošana

Piezīme:

— Standarta parauga lielums ir 200 bumbuļi katram testam. Intensīvākā paraugu ņemšanā bumbuļu skaits paraugā ir lielāks, testa rezultāti var būt grūti iegūstami vai interpretējami. Tomēr šo procedūru var ērti izmantot arī paraugiem, kuros ir mazāk nekā 200 bumbuļu, ja nav pieejams nepieciešamais daudzums.

— Visu zemāk aprakstīto metožu validācija balstās uz 200 bumbuļu paraugu testēšana.

— Zemāk aprakstīto kartupeļu ekstraktu var izmantot arī kartupeļu gaišās gredzenpuves baktēriju *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* noteikšanai.

Papildu pirmapstrāde pirms parauga sagatavošanas.

a) Paraugus pirms testēšanas izturēt 25–30 °C temperatūrā līdz divām nedēļām, lai veicinātu visu *R. solanacearum* populāciju vairošanos;

b) kartupeļu bumbuļus nomazgāt. Starp katra parauga pārbaudi izmantot atbilstošus dezinfekcijas (ja veic *PCR* testu, izmanto hlora savienojumus, lai notīrītu iespējamo patogēna DNS) un mazgāšanas līdzekļus. Ļaut bumbuļiem nožūt. Mazgāšanas process ir īpaši lietderīga(taču nav obligāta) paraugiem, uz kuriem ir lieka augsnes kārta, un gadījumos, ja veic *PCR* testu vai tiešās izolācijas testu.

1.1.1. Ar tīru un dezinficētu skalpeli vai dārzeņu nazi noņemt mizu pie katra bumbuļa pamatnes (stolona), lai atsegtu vadaudus. Uzmanīgi izgriezt nelielus vadaudu gabalus no stolona pamatnes un pēc iespējas censties izgriezt mazāk bumbuļa mīkstuma (sk. vietnē http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

Piezīme: Atlasīt visus (puvušos) bumbuļus, kuriem ir aizdomīgie simptomi, un testēt tos atsevišķi.

Ja stolona pamatnes atdalīšanas laikā ir redzami iespējamie tumšās gredzenpuves simptomi, jāveic attiecīgā bumbuļa vizuālā pārbaude un jāiegriež bumbulis pie stolona pamatnes. Visus bumbuļus, kuriem ir iespējamie gredzenpuves simptomi, ne mazāk kā 2 dienas glabā istabas temperatūrā, lai notiktu pārkoksnēšanās, un tad bumbuļus glabā atvēsinātā veidā (4–10 °C temperatūrā), pienācīgi ievērojot karantīnas nosacījumus. Visi bumbuļi, tostarp tie, kuriem ir aizdomīgi simptomi, jāuzglabā saskaņā ar III pielikumu.

1.1.2. Savākt stolona pamatnes vadaudu gabalus jaunos vienreizlietojamos traukos, kurus var aizvērt un/vai stingri noslēgt (ja izmanto vairākkārt lietojamus traukus, tie ir rūpīgi jāiztīra un jādezinficē, izmantojot hlora savienojumus). Stolona pamatnes ieteicams apstrādāt nekavējoties. Ja tas nav iespējams, var uzglabāt traukā, nepievienojot buferšķīdumu ne ilgāk kā 72 stundas atvēsinātā veidā un ne vairāk kā 24 stundas istabas temperatūrā.

Apstrādāt stolona pamatnes vadaudu gabalus, izmantojot vienu no turpmākajām metodēm:

a) pārliet pamatnes vadaudu gabalus ar pietiekošu daudzumu (aptuveni 40 ml) ekstrakcijas buferšķīduma (4. papildinājums) un jaukt rotācijas kratītājā (50–100 apgr./min) 4 stundas pie temperatūras, kas zemāka par 24 °C, un 16–24 stundas atvēsinātā veidā;

b) homogenizēt stolona pamatnes ar pietiekošu daudzumu (aptuveni 40 ml) ekstrakcijas buferšķīduma (4. papildinājums) ar mikseri (*Waring* vai *Ultra Thurax*) vai sasmalcinot cieši noslēgtā vienreizlietojamā macerācijas maisiņā (piemēram, stingra polietilēna *Stomacher* vai *Bioreba*, 150 mm x 250 mm; kas sterilizēts ar jonizējošu starojumu), izmantojot gumijas āmuru vai atbilstošu smalcinātāju (piemēram, *Homex*).

Piezīme: Ja paraugi tiek homogenizēti mikserī, savstarpējas inficēšanās risks ir ļoti augsts. Veic piesardzības pasākumus, lai izvairītos no aerosola veidošanās vai izlīšanas ekstrakcijas procesa laikā. Nodrošina, ka katram paraugam tiek izmantoti sterilizēti miksera asmeņi un trauks. Ja veic *PCR testu*, jāizvairās no DNS pārnešanas uz traukiem vai smalcināšanas ierīcēm. Ja lieto *PCR testu*, sasmalcināšanu veic vienreizlietojamos maisiņos vai vienreizlietojamos traukos.

1.1.3. Virsējo dzidro slāni dekantēt. Ja šķidrums ir pārāk duļķains, tas jādzidrina, lēni centrifugējot (ne vairāk kā pie 180 g 10 min 4–10 °C temperatūrā) vai ar vakuumfiltrēšanu (40–100 μm), mazgājot filtru ar papildu (10ml) ekstrakcijas šķīdumu.

1.1.4. Baktēriju frakcijas koncentrēt, 15 min 4–10 °C temperatūrā centrifugējot pie 7 000 g (vai 10 min pie 10 000 g), un, nesamaisot nogulsnes, noliet dzidro virsējo šķidruma slāni.

1.1.5. Atkārtoti suspendēt nogulsnes 1,5 ml ekstrakta koncentrāta buferšķīdumā (4. papildinājums). Izmantot 500 μl *R. solanacearum*, 500 μl *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* un 500 μl references vajadzībām. Iegūstot galīgo koncentrāciju 10–25 % (v/v), pievienot sterilu glicerīnu 500 μl references alikvotai un atlikušajai testa alikvotai, samaisīt un uzglabāt - 16 līdz - 24 °C temperatūrā (nedēļas) vai - 68 līdz - 86 °C (mēnešus). Testa alikvotas testēšanas laikā uzglabāt 4–10 °C temperatūrā.

Atkārtota sasaldēšana un atkausēšana nav ieteicama.

Ja ekstraktu nepieciešams transportēt, nodrošina pārvadāšanu ledusskapī 24 laikā.

1.1.6. *R. solanacearum* pozitīvie kontroles materiāli un paraugi obligāti jāapstrādā atsevišķi, lai izvairītos no inficēšanās. Tas attiecas uz *IF* priekšmetstikliņiem un uz visiem testiem.

1.2. Testēšana

Sk. shēmu, testēšanas metožu aprakstu un optimizētos protokolus attiecīgajos papildinājumos:

Selektīvā izolācija (sk. VI iedaļas A.4. punktu)

IF tests (sk. VI iedaļas A.5. punktu)

PCR tests (sk. VI iedaļas A.6. punktu)

FISH tests (sk. VI iedaļas A.7. punktu)

ELISA tests (sk. VI iedaļas A.8. punktu)

Biopatogenitātes tests (sk. VI iedaļas A.9. punktu)

2. **Sīki izstrādātas metodes *R. solanacearum* noteikšanai un identifikācijai asimptomātiskos kartupeļu, tomātu vai citos saimniekaugu paraugos**

2.1. Paraugu sagatavošana

Piezīme: Lai noteiktu latentās *R. solanacearum* populācijas, ieteicams testēt apvienotus paraugus. Procedūru var ērti izmantot arī apvienotiem paraugiem no ne vairāk kā 200 stublāju daļām. Ja tiek veikti apsekojumi, tiem jābalstās uz statistiski reprezentatīviem izmeklējamās augu populācijas paraugiem.

2.1.1. Ievietot 1–2 cm stublāju segmentus slēgtā sterilā traukā, ievērojot šādas paraugu ņemšanas procedūras:

Tomātu stādi: Ar tīru dezinficētu nazi atdalīt 1 cm lielu segmentu no katra stublāja pamatnes pavisam nedaudz virs augsnes līmeņa.

Laukā vai siltumnīcā audzēti tomātu augi: Ar tīru, dezinficētu nazi atdalīt katra auga pašu apakšējo sānu dzinumu, nogriežot to tieši virs savienojuma ar galveno stublāju. Atdalīt 1 cm lielu segmentu katra sānu dzinuma apakšdaļā.

Citi saimniekaugi: Ar tīru dezinficētu nazi vai atzarošanas šķērēm atdalīt 1 cm lielu segmentu no katra stublāja pamatnes pavisam nedaudz virs augsnes līmeņa. Attiecībā uz *S. dulcamara* vai citiem saimniekaugiem, kas aug ūdenī, atdalīt 1–2 cm lielus segmentus no zemūdens stublāja vai stolona saknēm, kas atrodas ūdenī.

Ja paraugus ņem konkrētā teritorijā, ieteicams testēt statistiski reprezentatīvus paraugus no vismaz 10 augiem katrā potenciālajā nezāļu saimniekaugu paraugu ņemšanas vietā. Patogēnu visdrošāk var noteikt vēlu pavasarī, vasarā un rudenī, kaut arī dabīgās infekcijas daudzgadīgos *Solanum dulcamara*, kas aug ūdenstecēs, var konstatēt visu gadu. Zināmo saimniekaugu vidū ir pašizsējas kartupeļu augi, *Solanum dulcamara, S. nigrum, Datura stramonium* un citi nakteņu dzimtas augi. Vēl par saimniekaugiem uzskata *Pelargonium* spp. un *Portulaca oleracea*. Dažas nezāļu sugas Eiropā, kuru saknes vai sakneņi varētu būt potenciālie *R. solanacearum* 2 bioloģiskā varianta/3. rases saimnieki, noteiktos vides apstākļos ietver *Atriplex hastata, Bidens pilosa, Cerastium glomeratum, Chenopodium album, Eupatorium cannabinum, Galinsoga parviflora, Ranunculus scleratus, Rorippa* spp, *Rumex* spp., *Silene alba, S. nutans., Tussilago farfarra* un *Urtica dioica*.

Piezīme: Šajā stadijā var veikt iekšējo simptomu vizuālo pārbaudi (vadaudu krāsa vai bakteriālais eksudāts). Atlasīt visus stumbra segmentus, kuriem ir slimības simptomi, un tos testēt atsevišķi (sk. II iedaļu).

2.1.2. Neilgu laiku dezinficē stumbru segmentus ar 70 % etanolu un nekavējoties nosusina ar papīra salveti. Tad stublāja segmentus apstrādā pēc vienas no šādām metodēm:

a) apliet stublāju segmentus ar pietiekamu daudzumu (aptuveni 40 ml) ekstrakcijas buferšķīduma (4. papildinājums) un jaukt kratītājā (50–100 apgr./min) 4 stundas temperatūrā zem 24 °C, vai 16–24 stundas atvēsinātā veidā;

b) nekavējoties homogenizēt stublāja segmentus ar pietiekamu daudzumu ekstrakcijas šķīduma (4. papildinājums), sasmalcinot stingrā macerācijas maisiņā (piemēram, *Stomacher* vai *Bioreba*), izmantojot gumijas āmuru vai atbilstošu smalcinātāju (piemēram, *Homex*). Ja tūlītēja apstrāde nav iespējama, stublāja segmentus uzglabāt ne ilgāk kā 72 stundas atvēsinātā veidā un ne vairāk kā 24 stundas istabas temperatūrā.

2.1.3. Nostādināt 15 min, tad virsējo dzidro slāni dekantēt.

2.1.4. Baktēriju frakcijas ekstraktu vai koncentrātu parasti nav nepieciešams turpmāk dzidrināt, bet to var izdarīt filtrējot un/vai centrifugējot, kā aprakstīts III iedaļas 1.1.3. līdz 1.1.5. punktā.

2.1.5. Sadalīt neatšķaidīto vai koncentrēto paraugu ekstraktu 2 vienādās daļās. Uzglabāt vienu daļu 4–10 °C temperatūrā testēšanas laikā un otru daļu, ja nepieciešama turpmāka testēšana, uzglabāt, izmantojot 10–25 % (v/v) sterilu glicerīnu - 16 līdz - 24 °C temperatūrā (nedēļas) vai - 68 līdz - 86° C (mēnešus).

2.2. Testēšana

Sk. shēmu un testu aprakstu un optimizētos protokolus attiecīgajos papildinājumos:

Selektīvā izolācija (sk. VI iedaļas A.4. punktu)

IF tests (sk. VI iedaļas A.5. punktu)

PCR tests (sk. VI iedaļas A.6. punktu)

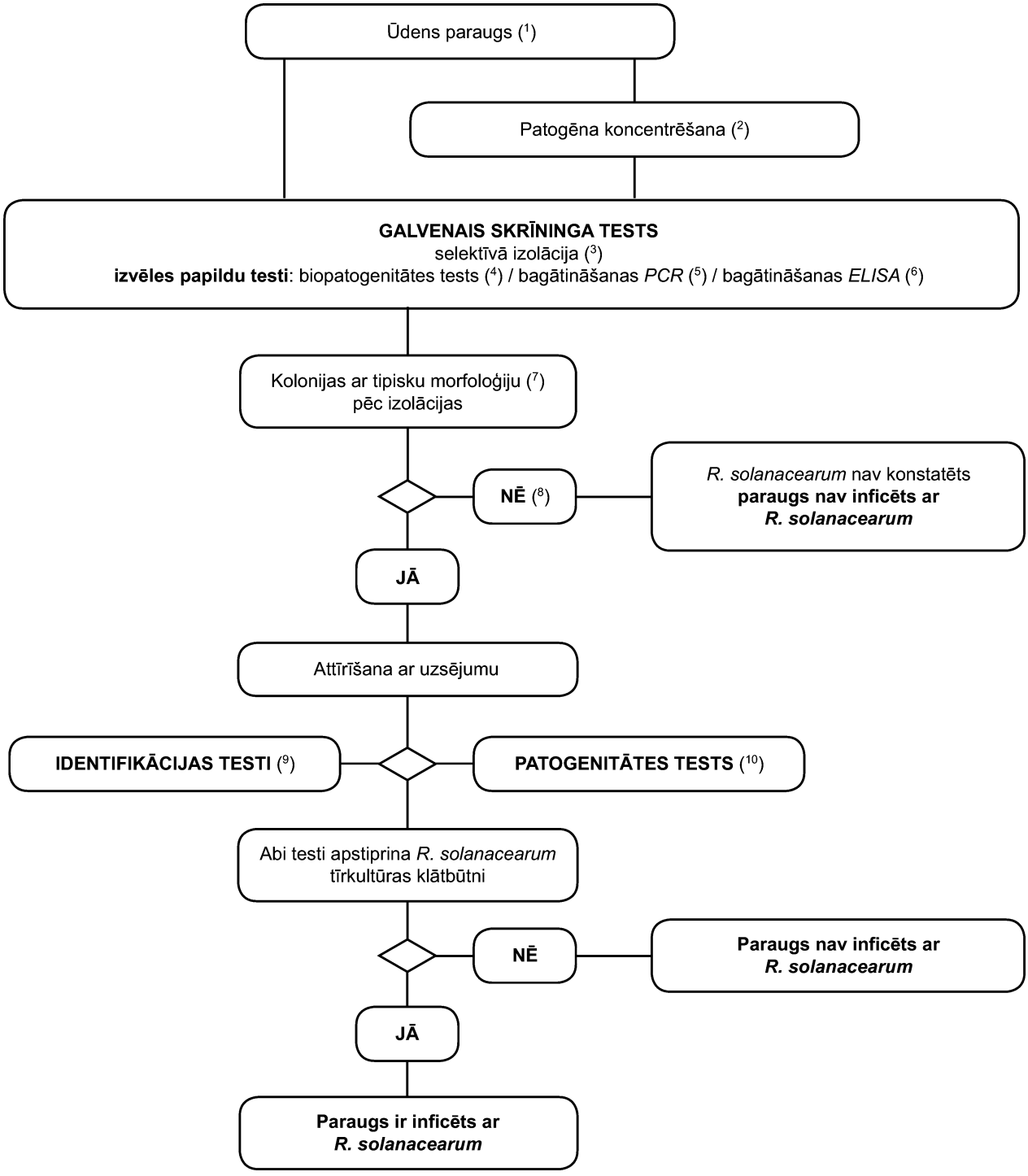
FISH tests (sk. VI iedaļas A.7. punktu)

ELISA tests (sk. VI iedaļas A.8. punktu)

Biopatogenitātes tests (sk. VI iedaļas A.9. punktu)

IV IEDAĻA

1. **Shēma *R. solanacearum* noteikšanai un identifikācijai ūdenī**



([1]) Ieteicamās paraugu ņemšanas procedūras aprakstītas IV iedaļas 2.1. punktā.

([2]) Patogēna koncentrēšanas metodes aprakstītas IV iedaļas 2.1. punktā. Koncentrēšana palielina gan patogēnu, gan konkurējošo saprofīto baktēriju populācijas, un tā ir ieteicama tikai gadījumā, ja tā nenomāc izolācijas testu.

([3]) Selektīvās izolācijas tests aprakstīts VI iedaļas A.4. punktā.

([4]) Biopatogenitātes tests aprakstīts VI iedaļas A.9. punktā.

([5]) Bagātināšanas *PCR* metodes aprakstītas VI iedaļas A.4.2. punktā un VI iedaļas A.6. punktā.

([6]) Bagātināšanas *ELISA* metodes aprakstītas VI iedaļas A.4.2. punktā un VI iedaļas A.8. punktā.

([7]) Kolonijas tipiska morfoloģija aprakstīta II iedaļas 3.d punktā.

([8]) Uzsējums vai biopatogenitātes tests var neizdoties, ja to nomāc vai izkonkurē saprofītās baktērijas. Ja lielas saprofīto baktēriju populācijas apdraud izolācijas ticamību, izolācijas testus atkārto pēc parauga izšķīdināšanas sterilā ūdenī.

([9]) Ticamu *R. solanacearum* tīrkultūru iespējamo izolātu identifikāciju panāk, izmantojot testus, kas aprakstīti VI iedaļas B. punktā.

([10]) Patogenitātes tests aprakstīts VI iedaļas C. punktā.

2. **Metodes *R. solanacearum* noteikšanai un identifikācijai ūdenī**

Princips

Validētā noteikšanas shēma, kas aprakstīta šajā iedaļā, izmantojama patogēnu noteikšanai virszemes ūdens paraugos, un to var izmantot arī kartupeļu pārstrādes vai notekūdeņu izplūdes paraugu testēšanai. Tomēr ir svarīgi ņemt vērā, ka sagaidāmā noteikšanas jutība ir atkarīga no substrāta. Izolācijas testa jutību ietekmē konkurējošo saprofīto baktēriju populācijas, kas parasti ir daudz lielākas kartupeļu pārstrādes un notekūdeņu izplūdēs nekā virszemes ūdenī. Kaut arī paredzēts, ka pēc turpmāk minētās shēmas var noteikt pat 10^3 šūnas uz litru virszemes ūdens, noteikšanas jutība kartupeļu pārstrādes vai notekūdeņu izplūdēs varētu būt ievērojami zemāka. Šā iemesla dēļ izplūdes ieteicams testēt pēc to attīrīšanas (piemēram, izgulsnēšanas vai filtrēšanas), kuru laikā saprofīto baktēriju populācijas tiek samazinātas. Ierobežojumus attiecībā uz testu shēmas jutību ņem vērā, novērtējot visu iegūto negatīvo rezultātu ticamību. Tā kā šī shēma tiek veiksmīgi izmantota apsekojumos, lai noteiktu patogēna esamību vai neesamību virszemes ūdenī, ierobežojumi attiecībā uz šo shēmu jāņem vērā līdzīgos kartupeļu pārstrādes vai notekūdeņu izplūdes apsekojumos.

2.1. Paraugu sagatavošana

Piezīme:

— *R. solanacearum* noteikšana virszemes ūdeņos visticamākā ir vēlā pavasarī, vasarā un rudenī, kad ūdens temperatūra pārsniedz 15 °C.

— Atkārtota paraugu ņemšana dažādos laikos minētā perioda laikā speciāli noteiktās paraugu ņemšanas vietās palielina noteikšanas ticamību, samazinot klimatisko svārstību ietekmi.

— Jāņem vērā stipru lietusgāžu ietekme un ūdensteces atrašanās vieta, lai izvairītos no atšķaidīšanas efekta, kas var slēpt patogēna klātbūtni.

— Ņemt virszemes ūdens paraugus saimniekaugu tuvumā, ja tie ir.

2.1.1. Izraudzītajās paraugu ņemšanas vietās ūdens paraugus ņemt, piepildot vienreizlietojamas sterilas mēģenes vai pudeles, ja iespējams, vismaz 30 cm dziļumā un vismaz 2 m no krasta. Pārstrādes un kanalizācijas notekūdeņu paraugus ņemt to izplūdes vietā. Ieteicamais paraugu lielums ir 500 ml no katras paraugu ņemšanas vietas. Ja ņem mazākus paraugus, katrā paraugu ņemšanas vietā ieteicams ņemt paraugus vismaz 3 reizes, katra parauga lielums ir 2 atkārtoti 30 ml apakšparaugi. Intensīvai apsekošanai izvēlas vismaz 3 paraugu ņemšanas vietas uz katriem ūdensteces 3 km un nodrošina, ka paraugus ņem no pietekām, kas ieplūst ūdenstecē.

2.1.2. Paraugus pārvadā vēsos un tumšos apstākļos (4–10 °C temperatūrā) un testē 24 stundu laikā.

2.1.3. Ja nepieciešams, baktēriju frakciju var koncentrēt, izmantojot vienu no šādām metodēm:

a) 30–50 ml apakšparaugus centrifugēt 10 min pie 10 000 g (15 min pie 7 000 g), vēlams 4–10 °C temperatūrā, noliet centrifugātu un atkārtoti suspendēt nogulsnes 1 ml nogulšņu buferšķīduma (4. papildinājums);

b) veikt membrānfiltrēšanu (minimālais poru izmērs 0,45 μm), pēc tam filtru skalot ar 5–10 ml nogulšņu buferšķīduma un skalošanas šķīdumus saglabāt. Šī metode piemērota lielākiem ūdens tilpumiem, kas satur saprofītus nelielā daudzumā.

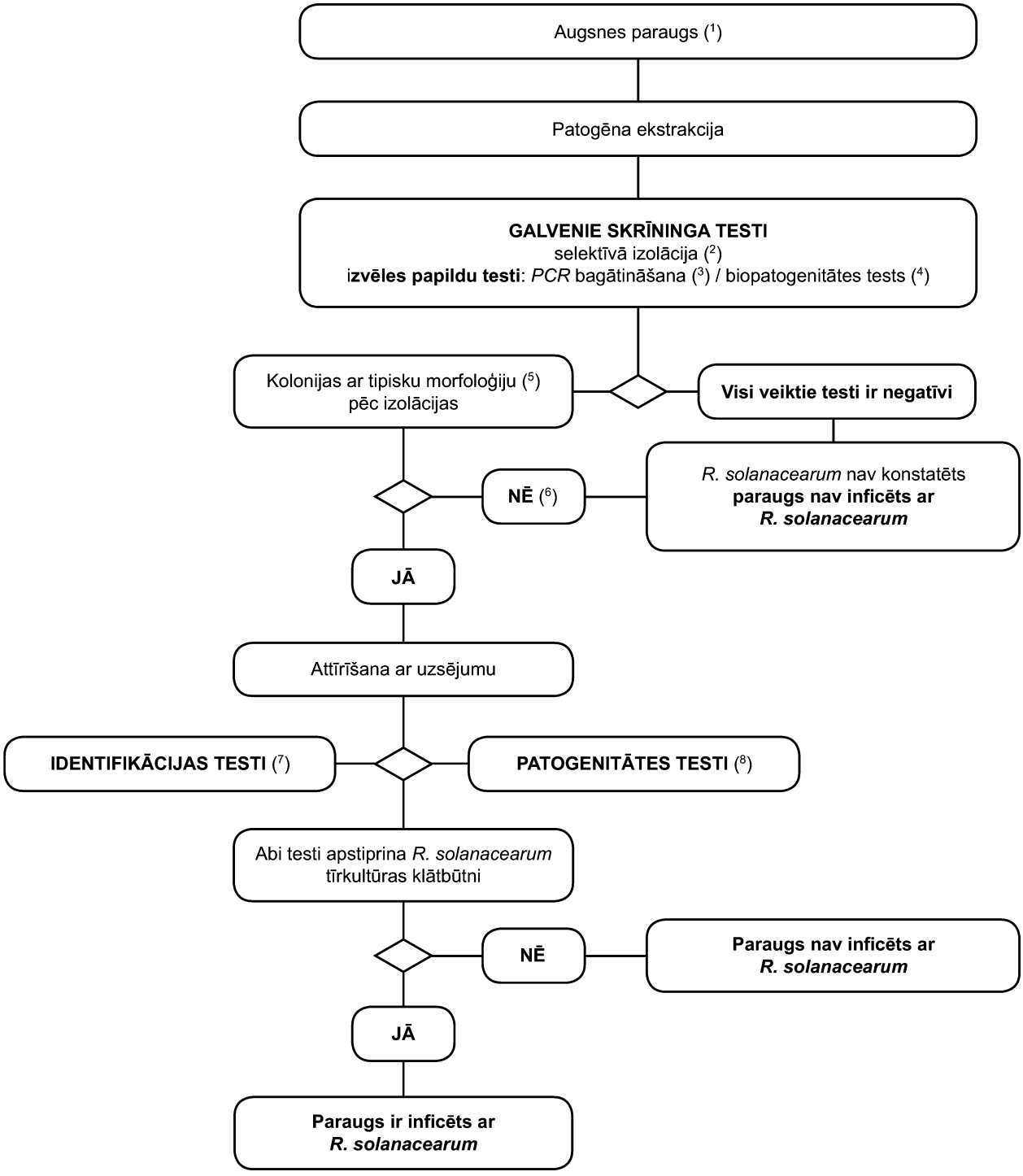
Parasti kartupeļu pārstrādes un kanalizācijas notekūdeņu izplūžu paraugiem veikt koncentrēšanu nav ieteicams, jo konkurējošo saprofīto baktēriju populācijas palielināšanās traucēs *Ralstonia solanacearum* noteikšanu.

2.2. Testēšana

Sk. shēmu un testu aprakstu attiecīgajos papildinājumos

V IEDAĻA

1. **Shēma *R. solanacearum* noteikšanai un identifikācijai augsnē**



([1]) Ieteicamās paraugu ņemšanas procedūras aprakstītas V iedaļas 2.1. punktā.

([2]) Selektīvās izolācijas tests aprakstīts VI iedaļas A.4. punktā.

([3]) Bagātināšanas *PCR* metodes aprakstītas VI iedaļas A.4.2. punktā un VI iedaļas A.6. punktā.

([4]) Biopatogenitātes tests aprakstīts VI iedaļas A.9. punktā.

([5]) Kolonijas tipiska morfoloģija aprakstīta II iedaļas 3.d punktā.

([6]) Uzsējums vai biopatogenitātes tests var neizdoties, ja saprofītās baktērijas izkonkurē vai nomāc to. Ja lielas saprofīto baktēriju populācijas apdraud izolācijas ticamību, izolācijas testus atkārto pēc parauga turpmākas atšķaidīšanas.

([7]) Ticamu *R. solanacearum* tīrkultūru iespējamo izolātu identifikāciju panāk, izmantojot testus, kas aprakstīti VI iedaļas B. punktā.

([8]) Patogenitātes tests aprakstīts VI iedaļas C. punktā.

2. **Metodes *R. solanacearum* noteikšanai un identifikācijai augsnē**

Principi

Validētā noteikšanas shēma, kas aprakstīta šajā iedaļā, izmantojama patogēna noteikšanai augsnes paraugos, taču to var izmantot arī kartupeļu pārstrādes cieto atkritumu vai notekūdeņu nosēdumu testēšanai. Tomēr jāņem vērā, ka šīs metodes nav pietiekami jutīgas, lai garantētu, ka tiek noteiktas nelielas un/vai neregulāri izkliedētas *Ralstonia solanacearum* populācijas, kuras ir iespējamas uz šo substrātu dabīgi inficētajiem paraugiem.

Ierobežojumi attiecībā uz šīs testu shēmas precizitāti jāņem vērā, novērtējot visu negatīvo rezultātu ticamību un arī izmantojot šo metodi apsekojumos, lai noteiktu patogēna esamību vai neesamību augsnē vai nosēdumos. Drošākais tests patogēna klātbūtnes noteikšanai tīruma augsnē ir šāds: iestādīt pret attiecīgajām slimībām ieņēmīgu saimniekaugu un novērot, vai tas inficējas, taču pat ar šo metodi neliela līmeņa inficēšanos var nekonstatēt.

2.1. Paraugu sagatavošana

2.1.1. Tīruma augsnes paraugus ņem pēc tiem pašiem standarta principiem kā paraugu ņemšana nematodes noteikšanai. Katram paraugam savāc 0,5–1 kg augsnes no 60 vietām 0,3 ha platībā, ņemot augsni aptuveni 10–20 cm dziļumā (vai 7 x 7 m lielā kvadrātā). Ja ir aizdomas par patogēna klātbūtni, palielina paraugu ņemšanas vietu skaitu līdz 120 vietām uz 0,3 ha. Līdz testēšanai paraugus glabā 12–15 °C temperatūrā. No kartupeļu pārstrādes atkritumiem un notekūdeņu nosēdumiem paraugus ņem, kopā savācot 1 kg no vietām, kas ir testēšanai paredzētajam kopējam nosēdumu apjomam reprezentatīvas. Katru paraugu pirms testēšanas rūpīgi sajauc.

2.1.2. Izmantojot rotācijas kratītāju (250 apgr./min), disperģēt 10–25 g lielus augsnes vai nosēdumu apakšparaugus 60–150 ml ekstrakcijas buferšķīdumā (4. papildinājums) ilgākais 2 stundu laikā. Ja nepieciešams, disperģēšanas veicināšanai maisīšanas laikā var pievienot 0,02 % sterila *Tween-20* un 10–20 g sterilas grants.

2.1.3. Testēšanas laikā suspensiju glabāt 4 °C temperatūrā.

2.2. Testēšana

Sk. shēmu un testu aprakstu attiecīgajos papildinājumos.

VI IEDĻA

OPTIMIZĒTIE PROTOKOLI *R. SOLANACEARUM* NOTEIKŠANAI UN IDENTIFIKĀCIJAI

A. *Diagnostikas un noteikšanas testi*

1. **Stublāju strīmings**

R. solanacearum atrašanos vītušos kartupeļu, tomātu vai citu saimniekaugu stublājos var noteikt ar turpmāk aprakstītā vienkāršā iepriekšējā testa palīdzību. Nogriezt stublāju tieši virs zemes. Griezuma vietu ievietot mēģenē ar tīru ūdeni. Novērot, vai pēc pāris minūtēm notiek raksturīgā pēkšņā bakteriālo gļotu pavedienu izplūšana no grieztajiem vadaudu kūlīšiem.

2. **Poli-β-hidroksibutirāta granulu noteikšana**

1. Uz mikroskopa priekšmetstikliņa sagatavo bakteriālā šķidruma uztriepi no inficētajiem audiem vai 48 stundas audzētas kultūras uztriepi uz *YPGA* vai *SPA* barotnes (2. papildinājums).

2. Sagatavo pozitīvās kontroles uztriepes no *R. solanacearum* 2. biovar celma un vajadzības gadījumā negatīvās kontroles uztriepes no zināmas PHB negatīvas sugas.

3. Ļauj nožūt, un katra priekšmetstikliņa apakšējo virsmu pāris reizes ātri pārlaiž pār liesmu, lai nofiksētu uztriepi.

4. Iekrāso preparātu ar Nīlas zilo vai Sudānas melno un mikroskopiski novēro kā aprakstīts turpmāk.

Nīlas zilā tests

a) Priekšmetstikliņu pārklāt ar Nīlas zilā A 1 % šķīdumu ūdenī un 10 min inkubēt 55 °C temperatūrā.

b) Notecināt iekrāsošanas šķīdumu. Noskalot nelielā ūdensvada ūdens strūklā. Lieko ūdeni nosusināt ar papīra salveti.

c) Pārklāt uztriepi ar 8 % etiķskābes šķīdumu ūdenī un 1 min izturēt apkārtējās vides temperatūrā.

d) Noskalot nelielā ūdensvada ūdens strūklā. Lieko ūdeni nosusināt ar papīra salveti.

e) Atkārtoti samitrināt ar ūdens pilienu un uzlikt segstikliņu.

f) Iekrāsoto uztriepi pārbaudīt ar epifluorescences mikroskopu pie 450 nm eļļas imersijā 600–1 000 reižu palielinājumā, izmantojot eļļas vai ūdens imersijas objektīvu.

g) Pārbaudīt, vai nav manāmas spilgti oranžas, fluorescējošas *PHB* granulas. Parastajā atstarotajā apgaismojumā pārbaudīt arī, vai granulas ir intracelulāras un vai šūnu morfoloģija ir *R. solanacearum* tipiska.

Sudānas melnā tests

a) Priekšmetstikliņu pārklāt ar Sudānas melnā 0,3 % šķīdumu 70 % etanolā un apkārtējās vides temperatūrā izturēt 10 minūtes.

b) Notecināt iekrāsošanas šķīdumu un noskalot nelielā ūdensvada ūdens strūklā, lieko ūdeni nosusināt ar papīra salveti.

c) Uz īsu brīdi iemērkt priekšmetstikliņus ksilolā un nosusināt ar salveti. *Uzmanību: Ksilols ir kaitīga viela, veikt nepieciešamos drošības pasākumus un strādāt velkmes skapī.*

d) Pārklāt priekšmetstikliņus ar 0,5 % (m/v) safranīna šķīdumu ūdenī un 10 sekundes atstāt apkārtējās vides temperatūrā. *Uzmanību: Safranīns ir kaitīga viela, veikt nepieciešamos drošības pasākumus un strādāt velkmes skapī.*

e) Noskalot nelielā ūdensvada ūdens strūklā, lieko ūdeni nosusināt ar papīra salveti.

f) Pētīt iekrāsotās uztriepes atstarotā ar gaismas mikroskopu eļļas imersijā 1 000 reižu palielinājumā, izmantojot eļļas imersijas objektīvu.

g) Novērot, vai *R. solanacearum* šūnās ar sārti iekrāsotām šūnu sieniņām ir konstatējamas zilganmelnas krāsas PHB granulas.

3. **Seroloģiskie aglutinācijas testi**

R. solanacearum šūnu aglutinācija bakteriālajā eksudātā vai simptomātisko audu ekstraktos vislabāk ir novērojama, izmantojot validētas antivielas (sk. 3. papildinājumu), kuras iezīmētas ar atbilstošiem krāsainiem marķieriem, piemēram, sarkanās *Staphylococcus aureus* šūnas vai krāsainas lateksa daļiņas. Ja lieto tirdzniecībā pieejamo komplektu (sk. 3. papildinājumu), ievērot ražotāja instrukcijas. Citos gadījumos izmanto šādu procedūru:

a) samaisa iezīmēto antivielu un bakteriālā eksudāta (aptuveni 5 µl no katra) suspensijas pilienus uz daudzlodziņu testa priekšmetstikliņu lodziņiem;

b) sagatavo pozitīvos un negatīvos kontrolparaugus, izmantojot *R solanacearum* 2. biovar un heterologo celmu suspensijas;

c) novēro, vai uzmanīgi maisot, 15 sekundēs pozitīvajos paraugos notiek aglutinācija.

4. **Selektīvā izolācija**

4.1. Selektīvais uzsējums

Piezīme: Pirms šo metodi izmanto pirmo reizi, veic iepriekšējus testus, lai nodrošinātu reproducējamu noteikšanas jūtību 10^3 līdz 10^4 kolonijas veidojošu *R. solanacearum* vienību uz ml; *R. solanacearum* pievienojami paraugu ekstraktiem, kuri iepriekš uzrādījuši negatīvus testa rezultātus.

Izmantot atbilstoši validētu selektīvo barotni, piemēram: SMSA (*Elphinstone et al.* modifikācijā 1996; sk. 2. papildinājumu).

Jāpievērš uzmanība arī tam, lai *R. solanacearum* atšķirtu no citām baktērijām, kas šajā barotnē var veidot kolonijas. Turklāt *R. solanacearum* kolonijas var uzrādīt atipisku morfoloģiju, ja plates ir pārblīvētas vai tajās ir antagonistiskas baktērijas. Ja ir aizdomas par konkurenci vai antagonismu, paraugu atkārtoti pārbauda, izmantojot cita veida testu.

Šīs metodes jutību var paaugstināt, izmantojot tikko sagatavotus paraugu ekstraktus. Tomēr šo metodi var izmantot arī paraugiem, kas ir glabāti glicerīnā - 68 līdz - 86 °C temperatūrā.

Kā pozitīvos kontrolparaugus sagatavo *R. solanacearum* virulentā 2. biovar celma suspensijas 10^6 kolonijveidotāju vienību 1 ml (piemēram, *NCPPB* 4156 = *PD* 2762 = *CFBP* 3857) desmitkārtīgus atšķaidījumus. Lai izvairītos no savstarpējas inficēšanās, pozitīvos kontrolparaugus sagatavot atsevišķi no testējamajiem paraugiem.

Katrai tikko sagatavotai selektīvās barotnes partijai pirms paredzētās paraugu testēšanas pārbauda tās atbilstību patogēna attīstībai.

Testēt kontroles materiālus tāpat kā paraugus.

4.1.1. Izmantot atbilstošu atšķaidījumu uzsējumu metodi, kuras mērķis ir nodrošināt attīrīšanu no visām fona saprofītajām kolonijas veidojošajām populācijām. Uz katras plates izlīdzināt 50–100 ml parauga ekstrakta un atšķaidījuma.

4.1.2. Plates inkubēt 28 °C temperatūrā. Nolasīt pēc 48 stundām, un pēc tam katru dienu līdz sestajai dienai. Tipiskas *R. solanacearum* kolonijas uz *SMSA* barotnes ir pienbaltas krāsas, plakanas, neregulāras un šķidras konsistences, un pēc 3 dienu inkubācijas vidū attīstās sārts līdz asinssarkans iekrāsojums, iekšpusē ar svītrām vai spirālveida veidojumiem (sk. tīmekļa vietnē http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

Piezīme: Dažkārt uz šīs barotnes var veidoties atipiskas *R. solanacearum* kolonijas. Tās var būt nelielas, apaļas, pilnīgi sarkanā krāsā iekrāsotas un nešķidras konsistences vai daļēji šķidras konsistences, tāpēc tās ir grūti atšķirt no saprofītām kolonijas veidojošām baktērijām.

4.1.3. Attīrīt iespējamās *R. solanacearum kolonijas* pēc uzklāšanas vai uzsējuma uz universālās barotnes, lai iegūtu izolētas kolonijas (sk. 2. papildinājumu).

4.1.4. Kultūras īslaicīgi glabā sterilā ūdenī (pH 6–8, nesatur hloru) istabas temperatūrā tumsā, vai ilglaicīgi glabā piemērotā krioprotektanta barotnē - 68 līdz - 86 °C temperatūrā vai liofilizētas.

4.1.5. Identificē iespējamās kultūras (sk. VI iedaļas B. punktu) un veic patogenitātes testu (sk. VI. Iedaļas C. punktu).

Selektīvo uzsējumu testa rezultātu interpretēšana

Selektīvo uzsējumu testa rezultāts ir negatīvs, ja pēc 6 dienām nav konstatētas baktēriju kolonijas vai nav konstatētas *R. solanacearum* tipiskas iespējamās kolonijas, ar nosacījumu, ka nepastāv aizdomas par to, ka citu baktēriju konkurences vai antagonisma dēļ tās ir inhibētas, un ka pozitīvajā kontrolparaugā ir atrastas *R. solanacearum* tipiskās kolonijas.

Selektīvo uzsējumu tests ir pozitīvs, ja tiek izolētas iespējamās *R. solanacearum* kolonijas.

4.2. Bagātināšanas procedūra

Izmanto validētu bagātināšanas barotni, piemēram, Wilbrink modificēto barotni (sk. 2. papildinājumu).

Šo procedūru var izmantot arī, lai selektīvi pavairotu R. solanacearum *populācijas paraugu ekstraktos un paaugstinātu noteikšanas jutību. Procedūrā efektīvi izšķīdina arī* PCR *reakcijas inhibitorus (1:100). Jāņem vērā, ka* R. solanacearum *bagātināšana tomēr var neizdoties saprofīto organismu, kuri bieži vien tiek vienlaicīgi bagātināti, konkurences vai antagonisma dēļ. Šā iemesla dēļ var būt grūti izolēt R. solanacearum no bagātinātajām līdzīgajām kultūrām. Turklāt sakarā ar to, ka seroloģiski radniecīgo saprofītu populācijas var palielināt, izmantojot ELISA testu, ieteicams lietot nevis poliklonālās antivielas, bet īpašas monoklonālās antivielas.*

4.2.1. *PCR* bagātināšanai 100 µl parauga ekstrakta pievieno 10 ml bagātināšanas šķīdumam (2. papildinājums), kuru alikvotas iepriekš pārnestas mēģenēs vai kolbās, kurās nav DNS. *ELISA* bagātināšanai var parauga ekstraktu var ņemt lielākā attiecībā pret bagātināšanas šķīdumu (piemēram, 100 µl uz 1,0 ml bagātināšanas šķīduma).

4.2.2. Izturēt 72 stundas 27–30 °C temperatūrā kustīgā vai statiskā uzsējumā, cieši neaiztaisot aizbāzni, lai nodrošinātu gaisa apmaiņu.

4.2.3. Pirms izmantošanas *ELISA* vai *PCR* testos rūpīgi sajaukt.

4.2.4. Ar bagātināto šķīdumu veic identiskas darbības tām, kā tika apstrādāti paraugi iepriekš aprakstītajos testos.

Piezīme: Ja ir aizdomas par *R. solanacearum* bagātināšanas kavēšanu dažu konkurējošo saprofīto baktēriju lielu populāciju dēļ, labākus rezultātus var nodrošināt paraugu ekstraktu bagātināšana pirms centrifugēšanas vai cita veida koncentrēšanas.

5. **IF tests**

Princips

IF testu ieteicams izmantot kā galveno skrīninga testu, jo ir pierādīts noteikšanas sliekšņu sasniegšanai nepieciešamais robustums.

Ja *IF* testu izmanto kā galveno skrīninga testu un *IF* testa rezultāts ir pozitīvs, par otro skrīninga testu izmanto izolāciju, *PCR* vai *FISH* testu. Ja *IF* testu izmanto kā otro skrīninga testu un tā rezultāts ir pozitīvs, lai pabeigtu analīzes, jāveic turpmāka testēšana saskaņā ar testu shēmu.

Piezīme: Izmantot validētus *R. solanacearum* antivielu ieguves avotus (sk. http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Ieteicams noteikt katras jaunas antivielu partijas titru. Titrs tiek definēts kā lielākais atšķaidījums, pie kura panāk optimālu reakciju, testējot suspensiju, kas satur 10^5 līdz 10^6 homologa *R. solanacearum* celma šūnas mililitrā, izmantojot atbilstošu fluoresceīna izotiocianāta (FITC) konjugātu saskaņā ar ražotāja norādījumiem. Validētiem poliklonālajiem imūnserumiem IF titrs nedrīkst būt mazāks par 1:2 000. Testēšanas laikā antivielas jāizmanto kā darba atšķaidījumi, kas tuvi titram, vai vienāds ar to.

Testu veic, izmantojot tikko sagatavotus paraugu ekstraktus. Nepieciešamības gadījumā testu var sekmīgi veikt, izmantojot ekstraktus, kas glabāti – 68 līdz – 86 °C temperatūrā glicerīna šķīdumā. Glicerīnu no parauga nošķir, pievienojot 1 ml ekstrakta koncentrāta buferšķīduma (4. papildinājums), atkārtoti centrifugējot 15 minūtes ar 7 000 g un atkārtoti suspendējot līdzvērtīgu daudzumu ekstrakta koncentrāta buferšķīduma. Dažkārt tas nav nepieciešams, jo īpaši, ja paraugi ir fiksēti uz priekšmetstikliņiem ar liesmu.

Sagatavot atsevišķus pozitīvās kontroles priekšmetstikliņus homologam celmam vai kādam citam kartupeļu ekstraktā suspendētam references *R. solanacearum* celmam, kā minēts 3.B papildinājumā, un, ja vajadzīgs, arī buferšķīdumā.

Ja iespējams, kā līdzīgu kontrolparaugu uz tā paša priekšmetstikliņa izmanto dabīgi inficētus audus (kas saglabāti liofilizējot vai sasaldējot – 16 līdz – 24 °C temperatūrā).

Kā negatīvos kontrolparaugus izmanto tādu paraugu ekstrakta alikvotas, kuras pirms tam uzrādījušas negatīvus testa rezultātus.

Standartizēti pozitīvie un negatīvie kontroles materiāli, kas paredzēti lietošanai šajā testā, ir uzskaitīti 3. papildinājumā.

Izmantot daudzlodziņu priekšmetstikliņus, kuriem, vēlams, būtu 10 lodziņi vismaz 6 mm diametrā.

Testēt kontroles materiālus tāpat kā paraugu(-us).

5.1. Sagatavot testu priekšmetstikliņus pēc vienas no šādām procedūrām

i) Ekstrakta koncentrātam ar samērā nelielām cietes nogulsnēm:

ar pipeti pirmajā lodziņā pārnes kartupeļu ekstrakta koncentrāta 1/100 atšķaidījuma (15 µl lodziņam ar 6 mm diametru – lielākiem lodziņiem šo daudzumu proporcionāli palielināt). Pēc tam līdzīgu daudzumu neatšķaidīta ekstrakta koncentrāta (1/1) pārnest rindā atlikušajos lodziņos. Otro rindu var izmantot kā dublikātu vai otram paraugam, kā parādīts 1. att.;

ii) pārējiem ekstrakta koncentrātiem:

sagatavot atkārtoti suspendētu ekstrakta koncentrātu decimālatšķaidījumus (1/10, 1/100) ekstrakta koncentrāta buferšķīdumā. Ar pipeti lodziņu rindā pārnes vienādu daudzumu atkārtoti suspendētā ekstrakta koncentrāta (15 µl atbilst lodziņam ar 6 mm diametru – lielākiem lodziņiem šo daudzumu proporcionāli palielināt). Otro rindu var izmantot kā dublikātu vai otram paraugam, kā parādīts 2. att.

5.2. Pilienus nožāvēt apkārtējās vides temperatūrā vai sildot līdz 40–45 °C. Baktēriju šūnas nofiksēt uz priekšmetstikliņa karsējot (15 min 60 °C temperatūrā), apdedzinot ar liesmu, izmantojot 95 % etanolu vai saskaņā ar antivielu piegādātāju īpašiem norādījumiem.

Nepieciešamības gadījumā fiksētos priekšmetstikliņus pirms turpmākas testēšanas var uzglabāt sasaldētā veidā žāvēšanas kastē iespējami īsāku laika posmu (ne vairāk kā 3 mēnešus).

5.3. IF procedūra

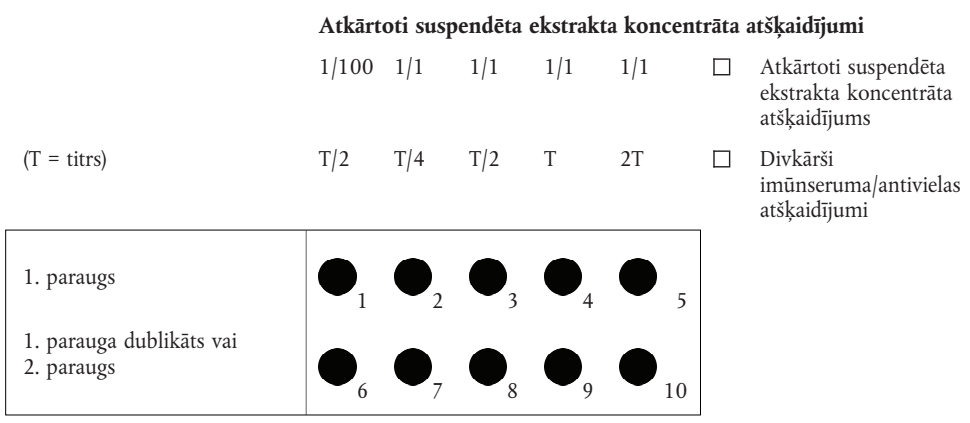
i) Sagatavojot testa priekšmetstikliņus atbilstoši 5.1. punkta i) apakšpunktam:

sagatavot divkāršu atšķaidījumu komplektu. Pirmajā lodziņā jābūt 1/2 titra (T/2), pārējās – 1/4 titra (T/4), 1/2 titra (T/2), pilnam titram (T) un divkāršam titram (2T);

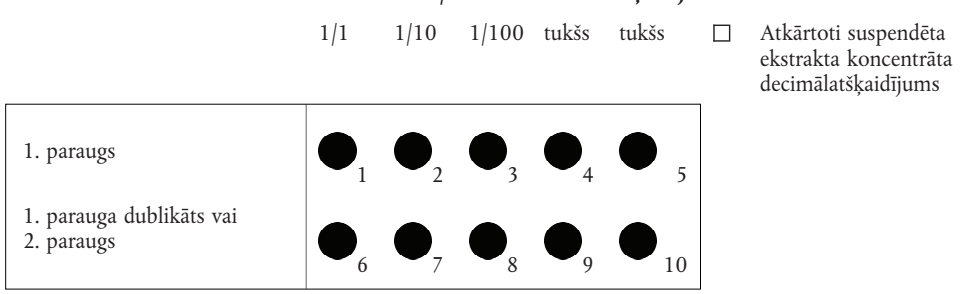
ii) sagatavojot testa priekšmetstikliņus atbilstoši 5.1. punkta ii) apakšpunktam:

sagatavot antivielu darba atšķaidījumu (DA) *IF* buferšķīdumā. Darba atšķaidījums ietekmē noteikšanas specifiskumu.

1. attēls. Testa priekšmetstikliņa sagatavošana atbilstoši 5.1. punkta i)apakšpunktam un 5.3. punkta i) apakšpunktam



2. attēls. Testa priekšmetstikliņa sagatavošana atbilstoši 5.1. punkta ii) apakšpunktam un 5.3. punkta ii) apakšpunktam



5.3.1. Priekšmetstikliņus salikt uz mitrām papīra salvetēm. Katru testēšanas lodziņu pilnībā pārklāt ar antivielas atšķaidījumu(-iem). Antivielas tilpumam, kas pārnests katrā lodziņā, jābūt vismaz vienādam ar ekstrakta tilpumu.

Ja nav antivielu piegādātāju īpašu norādījumu, jāveic šāda procedūra:

5.3.2. Priekšmetstikliņus iztur uz mitrām salvetēm apsegtā veidā 30 min apkārtējās vides temperatūrā (18–25 °C).

5.3.3. Nokratīt pilienus no katra priekšmetstikliņa un rūpīgi noskalot ar *IF* buferšķīdumu. Skalo, uz 5 minūtēm iemērcot *IF-Tween* buferšķīdumā (4. papildinājums) un pēc tam *IF* buferšķīdumā. Izvairīties no aerosolu veidošanās vai pilienu pārnešanas, kas var izraisīt sasvstarpēju inficēšanos. Uzmanīgi noņem lieko šķidrumu, viegli nosusinot.

5.3.4. Priekšmetstikliņus salikt uz mitrām papīra salvetēm. Nosegt testa lodziņus ar *FITC* konjugāta atšķaidījumu, ko izmantoja titra noteikšanai. Konjugāta tilpumam, kas uzklāts lodziņiem, jābūt vienādam ar izmantoto antivielu tilpumu.

5.3.5. Priekšmetstikliņus iztur uz mitrām salvetēm apsegtā veidā 30 min apkārtējās vides temperatūrā (18–25 °C).

5.3.6. Nokratīt konjugāta pilienus no priekšmetstikliņa. Pirms tam noskalot un nomazgāt (5.3.3.).

Rūpīgi nosusināt lieko šķidrumu.

5.3.7. Ar pipeti katrā lodziņā pārnest 5–10 µl 0,1 M fosfātbuferēta glicerīna (4. papildinājums) vai tirdzniecībā pieejamas krāsas noturīgumu sekmējošas saistvielas un uzlikt segstikliņu.

5.4. IF testa rezultātu nolasīšana

5.4.1 Testa priekšmetstikliņus pārbaudīt ar epifluorescences mikroskopu, izmantojot filtrus, kas piemēroti darbam ar *FITC*, ūdens vai eļļas imersijā 500 līdz 1 000 reižu palielinājumā. Lodziņus apskatīt pa diviem diametriem, kas krustojas taisnā leņķī, un pa perimetru. Paraugiem, kuros šūnas neredz vai redzamas nelielā daudzumā, izskatīt vismaz 40 mikroskopa lauciņus.

Vispirms pārbaudīt pozitīvā kontrolparauga priekšmetstikliņu. Šūnām jābūt spilgti fluorescējošām un pilnībā iekrāsotām pie noteiktā antivielu titra vai darba šķīduma. *IF* tests (VI iedaļas A.5. punkts) jāatkārto, ja krāsojumam ir novirze no normālā.

5.4.2. Pārbaudīt, vai priekšmetstikliņu testa lodziņos ir redzamas spilgtas fluorescējošas šūnas ar *R. solanacearum* raksturīgo morfoloģiju (sk. http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Fluorescences intensitātei jābūt tādai pašai kā pozitīvajam kontroles celmam vienādā antivielu atšķaidījumā. Šūnas ar nepilnīgu iekrāsojumu vai vāju fluorescenci netiek ņemtas vērā.

Tests jāatkārto, ja ir aizdomas par inficēšanos. Tas var būt gadījumā, ja visi attiecīgās partijas priekšmetstikliņi uzrāda inficētas šūnas sakarā ar buferšķīduma inficēšanu, vai ja inficētas šūnas tiek konstatētas uz segstikliņa (ārpus priekšmetstikliņa lodziņiem).

5.4.3. Pastāv vairākas problēmas, kas raksturīgas imunofluorescences testam. Ekstrakta koncentrātā no kartupeļu stolona pamatu vadaudu gabaliem un lakstu segmentiem varētu rasties fluorescences šūnu ar netipisku morfoloģiju fona populācijas un savstarpēji reaģējošas saprofītās baktērijas, kuru izmērs un morfoloģija ir līdzīgi *R. solanacearum*.

5.4.4. Jāņem vērā tikai raksturīgā izmēra fluorescējošas šūnas ar tipisku morfoloģiju pie antivielu titra vai darba atšķaidījumā, kā noteikts 5.3. punktā.

5.4.5. *IF* testa nolasījuma interpretācija:

i) ja atrastas spilgti fluorescējošas šūnas ar raksturīgo morfoloģiju, noteikt raksturīgo šūnu vidējo skaitu mikroskopa lauciņā un aprēķināt raksturīgo šūnu skaitu vienā mililitrā atkārtoti suspendēta ekstrakta koncentrāta (5. papildinājums).

IF tests ir pozitīvs paraugiem, kuros ir ne mazāk kā $5x10^3$ tipisko šūnu vienā ml atkārtoti suspendēta ekstrakta koncentrāta. Šādu paraugu uzskata par potenciāli inficētu un ir nepieciešama turpmāka testēšana;

ii) *IF* tests ir negatīvs paraugiem, kuros ir mazāk nekā $5x10^3$ šūnu vienā ml atkārtoti suspendēta ekstrakta koncentrāta, un paraugu uzskata par negatīvu. Turpmāka testēšana nav jāveic.

6. **PCR tests**

Principi

Ja *PCR* testu izmanto kā galveno skrīninga testu, un tā rezultāts ir pozitīvs, kā otro obligāto skrīninga testu izmanto izolāciju vai *IF* testu. Ja *PCR* testu izmanto par otro skrīninga testu un tā rezultāts ir pozitīvs, lai noteiktu galīgo diagnozi, jāveic turpmāka testēšana saskaņā ar testu shēmu.

Izmantot šo metodi kā galveno skrīninga testu ieteicams tikai pēc tam, kad ir apgūta vajadzīgā pieredze tā izmantošanā.

Piezīme: Iepriekšēja pārbaude ar šo metodi pieļauj reproducējamu noteikšanas jutību 10^3 līdz 10^4 *R. solanacearum* šūnu uz 1 ml; tās pievieno paraugu ekstraktiem, kas iepriekš uzrādījuši negatīvus rezultātus. Var būt nepieciešami optimizācijas eksperimenti, lai visās laboratorijās panāktu maksimālo noteikšanas jutību un specifiskumu.

Izmanto attiecīgi validētus *PCR* reaģentus un protokolus (sk. 6. papildinājumu). Ieteicams izvēlēties metodi ar iekšējo kontroli.

Izmanto piemērotus piesardzības pasākumus, lai izvairītos no parauga inficēšanas ar mērķa DNS. *PCR* testu veic pieredzējuši speciālisti īpaši aprīkotās molekulārās bioloģijas laboratorijās, lai samazinātu iespēju inficēt paraugu ar mērķa DNS.

Negatīvie kontrolparaugi (DNS ekstrakcija un *PCR*) vienmēr jāizmanto kā procedūras galīgie paraugi, lai konstatētu, vai ir notikusi DNS pārnese.

PCR testā jāietver šādi negatīvie kontrolparaugi:

— ekstrakta paraugs, kas pirms tam uzrādījis negatīvu rezultātu attiecībā uz *R. solanacearum* klātbūtni,

— buferšķīduma kontrolparaugi, kas izmantoti baktērijas un DNS ekstrakcijai no parauga,

— *PCR* reakcijas maisījums.

Jāiekļauj šādi pozitīvie kontrolparaugi:

— atkārtoti suspendēta ekstrakta koncentrāta alikvotas, kurām pievienota *R. solanacearum* (sagatavošanu *sk.* 3. papildinājuma B. punktā),

— no virulenta izolāta iegūta ūdens suspensija ar 10^6 *R. solanacearum* šūnām uz 1 ml (piemēram, *NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857*; sk. 3.B papildinājumu),

— ja iespējams, veicot *PCR*, izmantot arī DNS, kas iegūta no pozitīvajiem kontrolparaugiem.

Lai izvairītos no iespējamās inficēšanās, pozitīvie kontrolparaugi jāsagatavo atsevišķi no testējamajiem paraugiem.

Paraugu ekstrakti pēc iespējas jāattīra no augsnes. Tādēļ noteiktos gadījumos, ja paredzēts izmantot *PCR* protokolu, ieteicams sagatavot ekstraktus no mazgātiem kartupeļiem.

Standartizēti pozitīvie un negatīvie kontroles materiāli, kas paredzēti lietošanai šajā testā, ir uzskaitīti 3. papildinājumā.

6.1. DNS attīrīšanas metodes

Izmanto pozitīvos un negatīvos kontrolparaugus, kā iepriekš aprakstīts (sk. 3. papildinājumu).

Testēt kontroles materiālus tāpat kā paraugu(s).

Mērķa DNS attīrīšanai no sarežģītiem paraugu substrātiem ir pieejamas dažādas metodes, tādējādi atdalot *PCR* un citu fermentatīvo reakciju inhibitorus un parauga ekstraktā koncentrējot mērķa DNS. Lietošanai kopā ar validētajām *PCR* metodēm, kas aprakstītas 6. papildinājumā, ir optimizētas šādas metodes.

a) Pastrik (2000) metode

1) Ar pipeti pārnest 220 µl lizēšanas buferšķīduma (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) 1,5 ml mikromēģenē.

2) Pievienot 100 µl parauga ekstrakta un uz 10 min ievietot sildīšanas blokā vai ūdens vannā 95 °C temperatūrā.

3) Mēģeni 5 min ievietot ledū.

4) Pievienot 80 µl lizocīma rezerves šķīduma (50 mg lizocīma uz 1 ml 10 mM Tris HCl, pH 8,0) un 30 min inkubēt 37 °C temperatūrā.

5) Pievienot 220 µl *Easy DNA*® A šķīduma (*Invitrogen*), labi samaisīt un 30 min inkubēt 65 °C temperatūrā.

6) Pievienot 100 µl *Easy DNA*® B šķīduma (*Invitrogen*), spēcīgi samaisīt vorteksā, līdz paraugs kļūst viendabīgi viskozs.

7) Pievienot 500 µl hloroforma un maisīt līdz viskozitāte samazinās un maisījums kļūst viendabīgs.

8) Centrifugēt 20 min 4 °C temperatūrā pie 15 000 g, lai atdalītu fāzes un veidotu starpfāzi.

9) Pārnest virsējo fāzi tīrā mikromēģenē.

10) Pievienot 1 ml 100 % etanola (– 20 °C), samaisīt un 10 min turēt ledū.

11) Centrifugēt 20 min 4 °C temperatūrā pie 15 000 g un atdalīt etanolu no ekstrakta koncentrāta.

12) Pievienot 500 µl 80 % etanola (– 20 °C) un maisīt, mēģeni apvēršot.

13) Centrifugēt 10 min 4 °C temperatūrā pie 15 000 g, saglabāt ekstrakta koncentrātu un atdalīt etanolu.

14) Ļaut ekstrakta koncentrātam izžūt apkārtējā vidē vai DNS vakuumžāvētājā.

15) Atkārtoti suspendēt ekstrakta koncentrātu 100 µl sterila ultratīra ūdens (*UPW*) un vismaz 20 min atstāt istabas temperatūrā.

16) Līdz izmantošanai *PCR* glabāt – 20 °C temperatūrā.

17) Centrifugējot atdalīt baltas nogulsnes, ja tādas ir, un *PCR* izmantot 5 µl virsējā dzidrā slāņa šķīduma, kas satur DNS.

b) Citas metodes

Citas DNS ekstrakcijas metodes, piemēram, *Qiagen DNeasy Plant Kit*, var piemērot ar nosacījumu, ka ir pierādīta to līdzvērtīga efektivitāte DNS attīrīšanā no kontrolparaugiem, kas 1 ml satur 10^3 līdz 10^4 patogēnās baktērijas.

6.2. PCR

6.2.1. Sagatavot *PCR* testa un kontroles testa veidnes saskaņā ar apstiprinātajiem protokoliem (VI iedaļas A.6. punkts). Sagatavot vienu parauga DNS ekstrakta decimālatšķaidījumu (1:10 ultratīrā ūdenī).

6.2.2. Saskaņā ar publicētajiem protokoliem sagatavot atbilstošu *PCR* maisījumu vidē, kurā nevar notikt inficēšanās (6. papildinājums). Ja iespējams, ieteicams lietot daudzkārtējas *PCR* protokolu, kas ietver arī *PCR* iekšējo kontroli.

6.2.3. Pievienot 2–5 µl DNS ekstrakta uz 25 µl *PCR* reakcijas sterilās *PCR* mēģenēs saskaņā ar *PCR* protokoliem (sk. 6. papildinājumu).

6.2.4. Pievienot negatīvo kontrolparaugu, kas satur tikai *PCR* reakcijas maisījumu, un pievienot tās pašas izcelsmes ultratīru ūdeni, kāds tika izmantots *PCR* maisījumā parauga vietā.

6.2.5. Mēģenes ievietot tajā pašā termokamerā, ko izmantoja iepriekšējai orientējošai pārbaudei, un īstenot attiecīgi optimizētu *PCR* programmu (6. papildinājums).

6.3. *PCR* produkta analīze

6.3.1. Sadalīt *PCR* amplikonus ar agarozes gela elektroforēzi. Elektroforēzi izdara ar 5–8 V/cm vismaz 12 µl DNS pavairošanas reakcijas maisījuma no katra parauga, kas sajaukts ar 3 µl balasta buferšķīduma (6. papildinājums) 2,0 % (m/v) agarozes gelā tris-actetāt-EDTA (*TAE*) buferšķīdumā (6. papildinājums). Izmantot atbilstošu DNS marķieri, piemēram, 100 *bp ladder*.

6.3.2. Atklāt DNS joslas, 30–60 min krāsojot ar etīdija bromīdu (0,5 mg/l), darbā ar šo mutagēno vielu ievērojot atbilstošus piesardzības pasākumus.

6.3.3. Krāsotajā gelā ar īsviļņu UV diafanoskopiju (piemēram, λ = 302 nm) novēro pavairotos *PCR* produktus, kuru izmērs atbilst paredzētajam (6. papildinājums), procesu dokumentē.

6.3.4. Attiecībā uz visiem jaunajiem atradumiem/gadījumiem salīdzināt *PCR* amplikona autentiskumu, veicot fermentatīvu restrikcijas analīzi ar atlikušo pavairoto DNS paraugu, to optimālu laiku optimālā temperatūrā inkubējot ar atbilstošu fermentu un buferšķīdumu (sk. 6. papildinājumu). Identificēt fragmentus, kas sašķelti agarozes gela elektroforēzē, pēc iepriekš norādītās metodes un pēc krāsošanas ar etīdija bromīdu novērot restrikcijas fragmentu raksturīgo izvietojumu, izmantojot UV diafanoskopiju. Salīdzināt pozitīvās liecības pirms šķelšanas reakcijas un pēc tās.

PCR testa rezultātu interpretācija

PCR testa rezultāts ir negatīvs, ja *R. solanacearum* raksturīgais paredzamā izmēra *PCR* amplikons attiecīgajā paraugā netiek konstatēts, bet to konstatē visos pozitīvajos kontrolparaugos (daudzkārtējas *PCR* gadījumā ar augiem raksturīgiem iekšējās kontroles praimeriem: otrais paredzamā izmēra *PCR* produkts jāpavairo ar attiecīgo paraugu).

PCR testa rezultāts ir pozitīvs, ja tiek konstatēts īpašais *R. solanacearum* paredzamā izmēra *PCR* amplikons ar raksturīgo izvietojumu pēc restrikcijas (vajadzības gadījumā), ar nosacījumu, ka tas nav iegūts no kāda no negatīvajiem kontrolparaugiem. Ticamu pozitīva rezultāta apstiprinājumu var iegūt arī, atkārtojot testu ar otru *PCR* praimeru komplektu (6. papildinājums).

Piezīme: Var rasties aizdomas par *PCR* traucējumiem, ja paredzamais amplikons ir iegūts no pozitīvā kontroparauga, kas satur *R. solanacearum* ūdenī, bet pozitīvie *R. solanacearum* kontrolparaugi kartupeļu ekstraktā uzrāda negatīvus rezultātus. Daudzkārtējas *PCR* protokolos, kuri ietver *PCR* kontroles testus, uz reakcijas traucējumiem norāda tas, ka neviens no abiem amplikoniem netiek iegūts.

Aizdomas par inficēšanos var rasties, ja paredzamais amplikons ir iegūts no viena vai vairākiem negatīvajiem kontrolparaugiem.

7. **FISH tests**

Princips

Ja *FISH* testu izmanto kā pirmo skrīninga testu, un tā rezultāts ir pozitīvs, par otro obligāto skrīninga testu izmanto izolāciju vai *IF* testu. Ja *FISH* testu izmanto kā otro skrīninga testu un tā rezultāts ir pozitīvs, lai noteiktu galīgo diagnozi, jāveic turpmāka testēšana saskaņā ar testu shēmu.

Piezīme: Izmantot validētas īpašās *R. solanacearum* oligozondes (7. papildinājums). Iepriekšējai orientējošai pārbaudei ar šo metodi jānodrošina reproducējama noteikšana 10^3–10^4 *R. solanacearum* šūnu vienā ml, kas pievienotas paraugu ekstraktiem, kuri pirms tam uzrādījuši negatīvus rezultātus.

Turpmāk aprakstīto procedūru ieteicams veikt ar tikko sagatavota ekstrakta paraugu, bet to var sekmīgi izmantot arī tādu ekstrakta paraugu testēšanai, kas glabāti glicerīnā – 16 līdz – 24 °C vai – 68 līdz – 86 ° temperatūrā.

Par negatīvo kontroli izmanto ekstrakta parauga alikvotu, kas pirms tam ir uzrādījusi negatīvu rezultātu attiecībā uz *R. solanacearum* klātbūtni.

Kā pozitīvos kontrolparaugus sagatavo suspensijas, kuras satur 10^5 līdz 10^6 *R. solanacearum* 2. biovar šūnas (piemēram, *NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857* celms, sk. 3. papildinājumu) 1 mililitrā 0,01 M fosfāta buferšķīduma (FB), izmantojot 3–5 dienu uzsējumus. Sagatavot atsevišķus pozitīvo kontrolparaugu priekšmetstikliņus kartupeļu ekstraktā suspendētiem homologiem celmiem vai kādiem citiem *R. solanacearum* references celmiem, kā minēts 3. papildinājuma B. punktā.

FITC marķētās eubaktēriju oligozondes izmantošana paredz hibridizācijas procesa kontroli, jo tā iekrāso visas paraugā esošās eubaktērijas.

Standartizētie pozitīvās un negatīvās kontroles materiāli, kas paredzēti lietošanai šajā testā, norādīti 3. papildinājuma A. punktā.

Kontroles materiālus testē tāpat kā paraugu(-us).

7.1. Kartupeļu ekstrakta fiksēšana

Turpmāk minētais protokols ir balstīts uz *Wullings et al.* (1998).

7.1.1. Sagatavot fiksējošo šķīdumu (sk. 7. papildinājumu).

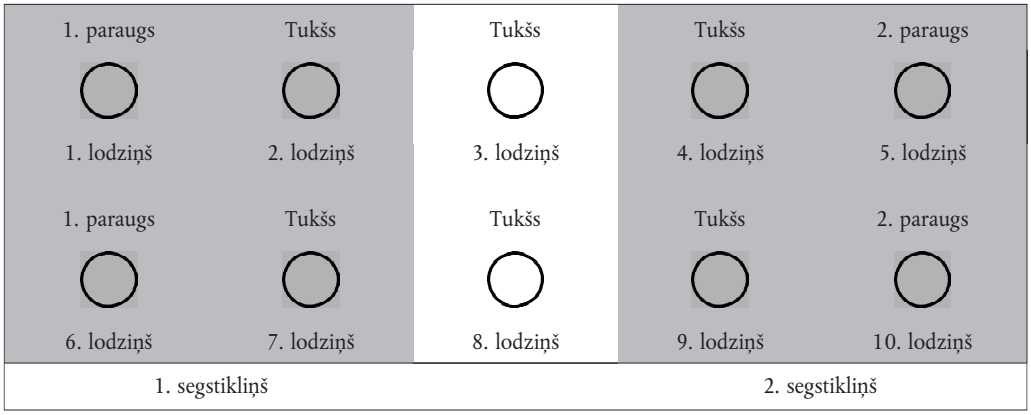
7.1.2. Ar pipeti pārnes 100 µl katra ekstrakta parauga mikromēģenē un 7 min centrifugē ar 7 000 g.

7.1.3. Atdala augšējo dzidro slāni un ekstrakta koncentrātu izšķīdina 200 µl fiksatora, kas sagatavots < 24 stundas pirms tam. Samaisa un 1 stundu iztur ledusskapī.

7.1.4. Centrifugē 7 min pie 7 000 g, atdala augšējo dzidro slāni un ekstrakta koncentrātu atkārtoti suspendē 75 µl 0,01M FB (sk. 7. papildinājumu).

7.1.5. Pārnes 16 µl fiksētās suspensijas uz tīra, daudzkārt izmantojama priekšmetstikliņa, kā parādīts 7.1. attēlā. Uz katra priekšmetstikliņa pārnes 2 dažādus neatšķaidītus paraugus, un izmanto 10 µl, lai sagatavotu 1:100 atšķaidījumu (0,01 M). Atlikušo parauga šķīdumu (49 µl) var glabāt – 20 °C temperatūrā, pievienojot 1 tilpuma vienību 96 % etanola. Gadījumā, ja *FISH* pārbaudei nepieciešama atkārtota procedūra, etanolu atdala centrifugējot, un pievieno tādu pašu daudzumu 0,01 M (sajauc ar vorteksu).

7.1. attēls. *FISH* priekšmetstikliņa izkārtojums.



7.1.6. Ļaut priekšmetstikliņiem nožūt (vai žāvēt uz priekšmetstikliņu žāvētāja 37 °C temperatūrā) un fiksēt ar liesmu.

Šajā posmā procedūru var pārtraukt un hibridizāciju turpināt nākamajā dienā. Priekšmetstikliņi jāglabā istabas temperatūrā sausā, no putekļiem tīrā telpā.

7.2. Hibridizācija

7.2.1. Šūnas dehidratēt, 1 min secīgi iemērcot 50 %, 80 % un 96 % etanolā. Ļaut priekšmetstikliņiem nožūt priekšmetstikliņu statīvā.

7.2.2. Sagatavot mitro inkubācijas kameru, izklājot hermētiskas kastes pamatu ar salveti vai filtrpapīru, kas iemērkts 1X hibrīdšķīdumā (7. papildinājums). Sagatavot kasti inkubācijai, vismaz uz 10 min ievietojot hibridizācijas žāvēšanas skapī 45 °C temperatūrā.

7.2.3. Uzklāt 10 µl hibridizācijas šķīduma (7. papildinājums) katra priekšmetstikliņa 8 lodziņiem (1., 2., 4., 5., 6., 7., 9. un 10. lodziņam; sk. 7.1. attēlu), divus lodziņus centrā atstājot tukšus (3. un 8.).

7.2.4. Uzlikt segstikliņus (24 x 24 mm) pirmajiem un pēdējiem 4 lodziņiem, izspiežot gaisu. Novietot priekšmetstikliņus hibridizācijai iepriekš uzsildītā mitruma kamerā uz 5 stundām 45 °C temperatūrā tumsā.

7.2.5. Sagatavot 3 vārglāzes, kurās ir 1 l *Milli Q* (molekulāras tīrības klases) ūdens, 1 l 1X hibridizācijas maisījuma (334 ml 3X hibridizācijas maisījuma un 666 ml *Milli Q* ūdens) un 1 l 1/8X hibridizācijas maisījuma (42 ml 3X hibrizācijas dmaisījuma un 958 ml *Milli Q* ūdens). Katru no tām sagatavot inkubācijai ūdens vannā 45 °C temperatūrā.

7.2.6. No priekšmetstikliņiem noņemt segstikliņus un novietot priekšmetstikliņu statīvā.

7.2.7. Noskalot lieko parauga daudzumu, 15 min izturot vārglāzē ar 1X hibridizācijas maisījuma 45 °C temperatūrā.

7.2.8. Ievietot priekšmetstikliņu statīvu 1/8X hibridizācijas maisījuma mazgāšanas šķīdumā un izturēt vēl 15 min.

7.2.9. Uz īsu brīdi iemērkt priekšmetstikliņus *Milli Q* ūdenī un novietot tos uz filtrpapīra. Nosusināt lieko mitrumu virsmu, uzmanīgi pārsedzot ar filtrpapīru. Katrā lodziņā pārnest 5–10 µl krāsojuma noturīgumu sekmējošas histoloģiska šķīduma (piemēram, *Vectashield, Vecta Laboratories*, Kanāda, ASV vai līdzvērtīga šķīduma) un visu priekšmetstikliņu pārsegt ar lielo segstikliņu (24 x 60 mm).

7.3. FISH testa rezultātu nolasīšana

7.3.1. Nekavējoties izskatīt imersijas eļļā priekšmetstikliņus ar epifluorescences mikroskopu 630 vai 1 000 reižu palielinājumā. Ar filtru, kas piemērots fluoresceīna izotiocianātam (*FITC*) eubaktēriju šūnas (tostarp izteiktākās gramnegatīvās šūnas) paraugā iekrāsojas fluorescējoši zaļā krāsā. Izmantojot tetrametilrodamīna 5-izotiocianāta filtru, Cy3 iekrāsotās *R. solanacearum* šūnas izskatās fluorescējoši sarkanas. Salīdzināt šūnu morfoloģiju ar pozitīvo kontrolparaugu morfoloģiju. Šūnām jābūt spilgti luminiscējošām un pilnībā iekrāsotām. *FISH* tests (VI iedaļas A.7. punkts) jāatkārto, ja krāsojumam ir novirze no normālā. Lodziņus apskatīt pa diviem diametriem, kas krustojas taisnā leņķī, un pa perimetru. Attiecībā uz paraugiem, kuri uzrāda nelielu daudzumu šūnu, izskatīt vismaz 40 mikroskopa lauciņus.

7.3.2. Pārbaudīt, vai priekšmetstikliņu testa lodziņos ir redzamas spilgtas fluorescējošas šūnas ar *R. solanacearum* raksturīgo morfoloģiju (sk. vietnē http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Fluorescences intensitātei jābūt tādai pašai kā pozitīvajam kontroles celmam vai intensīvākai. Šūnas ar nepilnīgu iekrāsojumu vai vāju fluorescenci netiek ņemtas vērā.

7.3.3. Ja ir aizdomas par inficēšanos, tests jāatkārto. Tas var būt gadījumā, ja visi attiecīgās partijas priekšmetstikliņi uzrāda inficētas šūnas sakarā ar buferšķīduma inficēšanu, vai ja inficētas šūnas tiek konstatētas uz segstikliņa (ārpus priekšmetstikliņa lodziņiem).

7.3.4. Pastāv vairākas problēmas, kas raksturīgas *FISH* testam. Ekstraktos no kartupeļu stolona pamatnēm un lakstu segmentiem varētu rasties netipiskas morfoloģijas fluorescences šūnu fona populācijas un savstarpēji reaģējošas saprofītās baktērijas, kuru izmērs un morfoloģija ir līdzīgi *R. solanacearum*, taču tas notiek daudz retāk nekā veicot *IF* testu.

7.3.5. Jāņem vērā tikai fluorescējošas šūnas ar tipisku morfoloģiju un raksturīgo izmēru.

7.3.6. *FISH* testa rezultātu interpretācija

i) Derīgus *FISH* testa rezultātus iegūst, ja visos pozitīvajos kontrolparaugos, izmantojot *FITC* filtru, konstatē koši zaļas fluorescējošas šūnas ar *R. solanacearum* raksturīgo izmēru un morfoloģiju, un, izmantojot rodamīna filtru, konstatē sarkanas fluorescējošas šūnas, un tās netiek konstatētas nevienā negatīvajā kontrolparaugā. Ja ir atrastas spilgti fluorescējošas šūnas ar raksturīgo morfoloģiju, noteikt raksturīgo šūnu vidējo skaitu mikroskopa lauciņā un aprēķināt raksturīgo šūnu skaitu vienā mililitrā atkārtoti suspendēta ekstrakta koncentrāta (4. papildinājums). Paraugus, kuros konstatē vairāk nekā 5×10^3 tipisko šūnu 1 ml atkārtoti suspendēta ekstrakta koncentrāta, uzskata par potenciāli inficētiem. Nepieciešama turpmāka testēšana. Paraugus, kuros konstatē mazāk kā 5×10^3 tipisko šūnu 1 ml atkārtoti suspendēta ekstrakta koncentrāta, uzskata par neinficētiem.

ii) *FISH* testa rezultāts ir negatīvs, ja, izmantojot rodamīna filtru, netiek konstatētas koši sarkanas fluorescējošas šūnas ar *R. solanacearum* raksturīgo izmēru un morfoloģiju, ar nosacījumu, ka raksturīgās koši sarkanās fluorescējošās šūnas konstatē pozitīvajos kontrolparaugos, izmantojot rodamīna filtru.

8. ***ELISA* tests**

Princips

ELISA testu var izmantot tikai kā izvēles testu papildus *IF, PCR* vai *FISH* testam, jo tā precizitāte ir relatīvi zema. Ja izmanto *DASI ELISA*, bagātināšana un monoklonālo antivielu izmantošana ir obligāta (sk. tīmekļa vietnē http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Testa paraugu bagātināšana pirms *ELISA* testa var būt noderīga, lai paaugstinātu testa jutību, bet tas var neizdoties citu paraugā esošo organismu konkurences dēļ.

Piezīme: Izmantot validētus *R. solanacearum* antivielu ieguves avotus (sk. http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Ieteicams noteikt titru katrai jaunai antivielu partijai. Titrs tiek definēts kā vislielākais atšķaidījums, pie kura panāk optimālu reakciju, testējot suspensiju, kas satur 10^5 līdz 10^6 homologa *R. solanacearum* celma šūnas mililitrā, izmantojot atbilstošus sekundāro antivielu konjugātus saskaņā ar ražotāja norādījumiem. Testa laikā antivielas izmanto darba atšķaidījumā, kas ir tuvs vai vienāds ar tirdzniecībā esošā sastāva titru.

Nosaka antivielu titru suspensijā, kas satur 10^5 līdz 10^6 *R. solanacearum* homologā celma šūnas uz mililitru.

Izmanto ekstrakta paraugu, kas pirms tam ir uzrādījis negatīvu rezultātu attiecībā uz *R. solanacearum* klātbūtni, un kā negatīvo kontrolparaugu izmanto savstarpēji nereaģējošas baktērijas suspensiju fosfāta buferšķīdumā (PBS).

Par pozitīvo kontroli izmanto alikvotas no parauga ekstrakta, kas pirms tam ir uzrādījis negatīvus rezultātus, kuram piejauc 10^5 līdz 10^6 *R. solanacearum* 2. biovar šūnas mililitrā (piemēram, NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857 celms, sk. 2. papildinājuma. A un B). Rezultātu salīdzināšanai uz katras plates izmanto standarta suspensiju, kas satur 10^5-10^6 *R. solanacearum* PBS šūnas mililitrā. Nodrošina, ka pozitīvie kontrolparaugi uz mikrotitra plates tiek pienācīgi nošķirti no testējamiem paraugiem.

Standartizēti pozitīvie un negatīvie kontroles materiāli, kas paredzēti lietošanai šajā testā, norādīti 3. papildinājuma A punktā.

Testēt kontroles materiālus tāpat kā paraugu(-us).

Ir validēti divi *ELISA* protokoli:

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

1) Izmanto 100–200 µl parauga ekstrakta alikvotas. (Karsēšana 100 °C temperatūrā 4 min ūdens vannā vai sildīšanas blokā dažos gadījumos var samazināt nespecifisko rezultātu skaitu).

2) Pievieno tādu pašu daudzumu divkāršā pārklāšanas buferšķīduma (4. papildinājums) un samaisa.

3) Katrā no vismaz 2 iedobēm uz mikrotitru plates (piemēram *Nunc-Polysorp*, vai līdzvērtīga) pievienot 100 µl alikvotu un 1 stundu inkubēt 37 °C temperatūrā vai atstāt līdz nākamajai dienai 4 °C temperatūrā.

4) Izkratīt ekstraktu no padziļinājumiem. Padziļinājumus trīs reizes izskalot ar *Tween* buferšķīdumu (4. papildinājums), pēdējās mazgāšanas reizes šķīdumu atstājot padziļinājumos vismaz 5 min.

5) Sagatavot piemērotu imūnseruma atšķaidījumu pret *R. solanacearum* bloķējošā buferšķīdumā (4. papildinājums). Attiecībā uz validētām tirdzniecībā esošajām antivielām, izmanto ieteicamos atšķaidījumus (parasti divreiz koncentrētākus nekā titrs).

6) Katrā padziļinājumā pievieno 100 µl un 1 stundu inkubē 37 °C temperatūrā.

7) Izkrata antivielu šķīdumu no padziļinājumiem un nomazgā tāpat kā iepriekš (4. punkts).

8) Sagatavo sekundārās antivielas bāziskās fosfatāzes konjugāta vajadzīgo atšķaidījumu bloķējošā buferšķīdumā. Katrā padziļinājumā pievieno 100 µl un 1 stundu inkubē 37 °C temperatūrā.

9) Izkrata konjugēto antivielu no padziļinājumiem un skalo tāpat kā iepriekš (4. punkts).

10) Katrā padziļinājumā pievieno 100 µl bāziskā fosfatāzes substrāta šķīduma (4. papildinājums). Inkubē tumsā apkārtējās vides temperatūrā un nolasa absorbciju pie 405 nm pēc regulāriem laika intervāliem 90 min laikā.

b) DASI *ELISA*

1) Sagatavo atbilstošu anti-*R. solanacearum* poliklonālā imunoglobulīna atšķaidījumu pārklājuma buferšķīdumā pH 9,6 (4. papildinājums). Katrā padziļinājumā pārnes 200 µl. Inkubē 4–5 stundas 37 °C temperatūrā vai 16 stundas 4 °C temperatūrā.

2) Trīs reizes skalo padziļinājumus ar PBS *Tween* (4. papildinājums).

Vismaz 2 padziļinājumos pārnes 190 µl parauga ekstrakta. Katrā platē divos padziļinājumos pārnes arī pozitīvos un negatīvos kontrolparaugus. Iztur 16 stundas 4 °C temperatūrā.

3) Trīs reizes skalo padziļinājumus ar PBS *Tween* (4. papildinājums).

4) Sagatavo atbilstošu *R. solanacearum* raksturīgo monoklonālo antivielu atšķaidījumu PBS (4. papildinājums), kas satur arī 0,5 % liellopu seruma albumīna (*BSA*) un katrā padziļinājumā pārnes 190 µl. Inkubē 2 stundas 37 °C temperatūrā.

5) Trīs reizes skalo padziļinājumus ar PBS *Tween* (4. papildinājums).

6) Sagatavo atbilstošu atšķaidījumu pretpeļu imunoglobulīnam, kas konjugēts ar bāzisko fosfatāzi buferšķīdumā. Katrā padziļinājumā pārnes 190 µl. Inkubē 2 stundas 37 °C temperatūrā.

7) Trīs reizes skalo padziļinājumus ar PBS *Tween* (4. papildinājums).

8) Sagatavo bāziskās fosfatāzes substrāta šķīdumu, kas satur 1 mg p-ntrofenilfosfāta 1 ml substrāta buferšķīduma (4. papildinājums). Katrā padziļinājumā pārnes 200 µl. Inkubē tumsā apkārtējās vides temperatūrā un nolasa absorbciju pie 40 nm pēc regulāriem laika intervāliem 90 min laikā.

ELISA testa rezultātu interpretācija

ELISA tests ir negatīvs, ja dublikātu paraugu vidējais optiskais blīvums (*OD*) ir mazāks par divkāršu negatīvo ekstrakta kontrolparaugu optisko blīvumu padziļinājumos ($< 2 \times OD$), ja pozitīvie kontrolparaugi uzrāda rezultātu, kas lielāks par 1,0 (pēc 90 minūšu inkubēšanas ar substrātu) un kas pārsniedz negatīvo paraugu ekstraktu divkāršotu optiskā blīvuma vērtību.

ELISA tests ir pozitīvs, ja dublikātu paraugu vidējais optiskais blīvums (*OD*) ir lielāks par divkāršu negatīvo ekstrakta kontrolparaugu optisko blīvumu padziļinājumos ($> 2 \times OD$), ja *OD* nolasījumi visos negatīvo kontrolparaugu padziļinājumos ir vairāk nekā divas reizes mazāki ($< 2 \times$) par pozitīvo kontrolparaugu optisko blīvumu.

Negatīvi *ELISA* nolasījumi pozitīvās kontroles padziļinājumos norāda, ka tests nav veikts pareizi vai tas ir inhibēts. Pozitīvi *ELISA* nolasījumi negatīvās kontroles padziļinājumos norāda uz savstarpēju inficēšanos vai uz to, ka ir parādījusies nespecifiska antiviela.

9. **Biopatogenitātes tests**

Piezīme: Iepriekšējā orientējošā pārbaudē ar šo metodi iespējams iegūt reproducējamu rezultātu, nosakot 10^3 līdz 10^4 kolonijas veidojošu *R. solanacearum* vienību uz 1 ml, tās pievienojot paraugu ekstraktiem, kas iepriekš uzrādījuši negatīvus rezultātus (sagatavošanu sk. 3. papildinājumā).

Visaugstākā noteikšanas jutība sagaidāma, izmantojot tikko sagatavotu paraugu ekstraktu un nodrošinot optimālus attīstības apstākļus. Tomēr šo metodi var veiksmīgi izmantot arī ekstraktiem, kas ir glabāti glicerīnā – 68 līdz – 86 °C temperatūrā.

Turpmāk minētais protokols ir balstīts uz *Janse* (1988).

9.1. Izmantot pret slimību ieņēmīgu šķirņu tomātu 10 testējamos augus (piemēram, *Moneymaker* vai šķirni, kas saskaņā ar laboratorijas atzinumu ir tikpat uzņēmīga pret slimību), no kuriem visi paraugi ir trešās īstās lapas fāzē. Audzēšanas sīku aprakstu sk. 8. papildinājumā. Alternatīvi var izmantot baklažānu augus (*Black Beauty* vai šķirni, kas ir tikpat ieņēmīga pret slimību), izmanto tikai augus, kuri ir 2.–3. lapas fāzē līdz pat trešā lapa pilnībā attīstījusies. Pierādīts, ka baklažānu augos simptomi ir mazāk izteikti un attīstās lēnāk. Tādēļ, ja tas ir iespējams, ieteicams izmantot tomātu stādus.

9.2. Starp testējamajiem augiem sadalīt 100 µl parauga ekstrakta.

9.2.1. Inokulācija ar šļirci

Augu stublājus inokulēt uzreiz virs dīgļlapām, izmantojot šļirci ar adatu zemādas injekcijām (ne mazāku par 23G). Sadalīt paraugu starp testējamiem augiem.

9.2.2. Inokulācija ar šķēlumu

Pieturot augu ar diviem pirkstiem, uz stublāja starp dīgļlapām un pirmo lapu ar pipeti ievadīt vienu pilienu suspendēta ekstrakta koncentrāta (apmēram 5–10 µl).

Ar sterilu skalpeli izdarīt aptuveni 1,0 cm garu diagonālu griezumu, kura dziļums ir apmēram 2/3 no stublāja diametra, griezienu sākot no ekstrakta koncentrāta piliena punkta.

Cieši noslēgt griezumu ar sterilu vazelīnu no šļirces.

9.3. Ar tādu pašu paņēmienu kā pozitīvo kontrolparaugu inokulēt piecus stādus ar 48 stundas izturētu *R. Solanacearum* biovar 2 virulenta celma ūdens suspensiju, kura satur 10^5 līdz 10^6 šūnas vienā mililitrā, un kā negatīvo kontrolparaugu inokulēt ar ekstrakta koncentrāta buferšķīdumu. Nodalīt pozitīvo un negatīvo kontrolparaugu augus no citiem augiem, lai novērstu savstarpēju inficēšanos.

9.4. Audzēt testējamos augus karantīnas apstākļos ne ilgāk kā četras nedēļas 25–30 °C temperatūrā un augsta relatīvā mitruma apstākļos, ik dienas aplaistot, lai novērstu ūdens izsīkšanu vai auga novīšanu ūdens trūkuma dēļ. Lai izvairītos no savstarpējas inficēšanās, pozitīvās un negatīvās kontroles augus audzē pilnībā atdalītās siltumnīcas dobēs vai audzēšanas kamerās, vai, ja nepietiek vietas, stingri nodalot to apstrādes laikus. Ja augi dažādiem paraugiem ir jāaudzē cieši blakus, atdalīt tos ar atbilstošiem aizslietņiem. Mēslojot, laistot, pārbaudot un veicot citas darbības, jāievēro piesardzība, lai neizraisītu savstarpēju inficēšanos. Ir ļoti svarīgi, lai siltumnīcās nebūtu kaitēkļu, jo tie var pārnest baktērijas no viena auga un citu.

Novērot, vai neparādās vīte, epinastija, hloroze un/vai aizkavēšanās augšanā.

9.5. Izolēt no inficētajiem augiem (II iedaļas 3. punkts) un identificēt *R. solanacearum* iespējamās tīrkultūras (VI iedaļas B punkts).

9.6. Ja pēc trim nedēļām nav novēroti simptomi, jāveic *IF*/*PCR*/izolācijas tests, izmantojot apvienotu paraugu, kas sastāv no 1 cm gariem stumbra posmiem, kuri no katra testa auga ņemti virs inokulācijas vietas. Ja testa rezultāts ir pozitīvs, veic atšķaidījuma uzsējumu (4.1. iedaļa).

9.7. Identificē iespējamās *R. solanacearum* tīrkultūras (VI iedaļas B punkts).

Biopatogenitātes testa rezultātu interpretēšana

Derīgus biopatogenitātes testa rezultātus iegūst, ja, pozitīvo kontrolparaugu augiem konstatējot tipiskus simptomus, baktērijas var atkārtoti izolēt no šiem augiem un negatīvajos kontrolparaugos simptomus nekonstatē.

Biopatogenitātes testa rezultāts ir negatīvs, ja testējamie augi nav inficēti ar *R. solanacearum*, ar noteikumu, ka *R. solanacearum* parādās pozitīvajā kontrolparaugā.

Biopatogenitātes testa rezultāts ir pozitīvs, ja testa augi ir inficēti ar *R. solanacearum*.

B. *IDENTIFIKāCIJAS TESTI*

Identificē iespējamās *R. solanacearum* izolātu tīrkultūras, izmantojot vismaz divus no minētajiem testiem, kas balstīti uz atšķirīgiem bioloģiskajiem principiem.

Attiecīgā gadījumā iekļaut zināmus references celmus katram veiktajam testam (sk. 3. papildinājumu).

1. **Barības vielu un fermentu identifikācijas testi**

Noteikt šādas fenotipiskās pazīmes, kas parasti ir vai nav konstatējamas *R. solanacearum*, saskaņā ar *Lelliot* un *Stead* (1987), *Klement et al.* (1990), *Schaad* (2001)

Tests	Paredzamais rezultāts
Fluorescējošu pigmentu veidošanās	–
Poli-β-hidroksibutirāta ieslēgumi	+
Oksidācijas/fermentācijas (O/F) tests	O+/F–
Katalāzes tests	+
Kovaka (*Kovac's*) oksidāzes tests	+
Nitrātu reducēšana	+
Citrātu izmantošana	+
Pieaugums 40 °C temperatūrā	–
Augšana 1 % NaCl	+
Augšana 2 % NaCl	–
Arginīna dihidrolāzes pārbaude	–
Želatīna sašķidrināšana	–
Cietes hidrolīze	–
Eskulīna hidrolīze	–
Levāna veidošanās	–

2. **IF tests**

2.1. Sagatavot suspensiju *IF* buferšķīdumā, kurā ir aptuveni 10^6 šūnu vienā ml (4. papildinājums).

2.2. Sagatavot atbilstoša imūnseruma divkārša atšķaidījuma sērijas (sk. vietnē http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

2.3. Veikt *IF* procedūru (VI iedaļas A.5. punkts).

2.4. *IF* testa rezultāts ir pozitīvs, ja *IF* kultūras titrs ir vienāds ar pozitīvā kontrolparauga titru.

3. **ELISA tests**

Piezīme: Ja veic tikai divus identifikācijas testus, papildus šai metodei neizmanto citu seroloģisko testu.

3.1. Sagatavot suspensiju, kurā ir aptuveni 10^8 šūnas uz ml 1X buferšķīduma (4. papildinājums).

3.2. Veikt *R. solanacearum* atbilstošu *ELISA* procedūru ar īpašu monoklonālo antivielu.

3.3. *ELISA* testa rezultāts ir pozitīvs, ja *ELISA* nolasījums, kas iegūts no uzsējuma, nav mazāks par pusi no pozitīvā kontrolparauga nolasījuma.

4. ***PCR* tests**

4.1. Sagatavot suspensiju molekulāras tīrības klases sterilā ūdenī, kurā ir aptuveni 10^6 šūnu vienā ml.

4.2. 100 µl šūnu suspensijas slēgtās mēģenēs 4 min termokamerā vai verdoša ūdens vannā karsēt 100 °C temperatūrā. Tad paraugus var glabāt – 16 līdz – 24 °C temperatūrā, līdz tie ir nepieciešami.

4.3. Veikt atbilstošās *PCR* procedūras, lai pavairotu raksturīgos amplikonus (piemēram, *Seal et.al.* (1993), *Pastrik* un *Maiss*, (2000), *Pastrik et al.* (2002); *Boudazin et al.* (1999), *Opina et al.* (1997), *Weller et.al.* (1999).

4.4. *R. solanacearum* identifikācija ir pozitīva, ja *PCR* amplikoniem ir tādi paši restrikcijas fragmentu garuma polimorfismi un amplikoni ir vienādi pēc izmēra ar pozitīvā kontrolparauga celmu.

5. **FISH tests**

5.1. Ultratīrā ūdenī sagatavot suspensiju, kurā ir aptuveni 10^6 šūnu vienā ml.

5.2. Veikt *FISH* procedūru (VI iedaļas A.7. punkts), kurā ir vismaz divas *R. solanacearum* raksturīgās oligozondes (7. papildinājums).

5.3. *FISH* testa rezultāts ir pozitīvs, ja uzsējuma un pozitīvā kontrolparauga reakcijas ir vienādas.

6. **Taukskābju sastāva profilēšana (FAP)**

6.1. Kultūru audzēt 28 °C temperatūrā 48 stundas uz triptāzes sojas agara (*Oxoid*).

6.2. Izmantot atbilstošu *FAP* procedūru (*Janse*, 1991; *Stead*, 1992).

6.3. *FAP* testa rezultāts ir pozitīvs, ja iespējamās kultūras profils ir vienāds ar pozitīvā kontrolparauga profilu. *Ralstonia sp.* raksturīgās taukskābes ir 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH un 18:1 2OH, turklāt *Ralstonia sp.* ļoti raksturīgs ir 16:0 3OH trūkums.

7. **Celma raksturojuma metodes**

Celma raksturojums, izmantojot vienu no zemāk aprakstītajām metodēm, ir ieteicams katrā jaunā *R. solanacearum* izolācijas gadījumā.

Ja vajadzīgs, iekļaut zināmus references celmus katram veiktajam testam (sk. 3. papildinājumu).

7.1. Biovara noteikšana

R. solanacearum tiek sadalīts biovaros, pamatojoties uz spēju izmantot un/vai oksidēt trīs disaharīdus un trīs heksozes spirtus (*Hayward*, 1964, un *Hayward et al.*, 1990). Biovara testa augšanas barotne ir aprakstīta 2. papildinājumā. Šajā testā var barotni inokulēt ar *R. solanacearum* izolāta tīrkultūru un inkubēt 28 °C temperatūrā. Ja barotni sadala pa 96 sterilām šūnu kultivēšanas plātnēm ar padziļinājumiem (200 µl katrā padziļinājumā), uz testa pozitīvu iznākumu norāda krāsas maiņa no olīvzaļas uz dzeltenu, kas novērojama 72 stundu laikā.

	Biovars				
	1	2	3	4	5
Izmantošana:					
maltozes	–	+	+	–	+
laktozes	–	+	+	–	+
D (+) celobiozes	–	+	+	–	+
mannīta	–	–	+	+	+
sorbīta	–	–	+	+	–
dulcīta	–	–	+	+	–

Papildu testi atšķir 2. biovara apakšfenotipus.

	2.A biovars (izplatīts visā pasaulē)	b2.A iovars (izplatīts Čīlē un Kolumbijā)	2.T biovars (izplatīts tropu rajonos)
Trehalozes izmantošana	–	+	+
Mezoinozīta izmantošana	+	–	+
D-ribozes izmantošana	–	–	+
Pektolītiskā aktivitāte [1]	zema	zema	augsta

[1] Sk. *Lelliott* un *Stead* (1987).

7.2. Genoma nospiedums

R. solanacearum kompleksa celmu molekulāro diferenciāciju var veikt, izmantojot vairākas metodes, tostarp:

7.2.1. restrikcijas fragmentu garuma polimorfisma (*RFLP*) analīzi (*Cook et.al.*, 1989);

7.2.2. atkārtotu *PCR* sekvenci, izmantojot *REP, BOX* un *ERIC* praimerus (*Louws et al.*, 1995; *Smith et al.*, 1995);

7.2.3. Pavairoto fragmentu garuma polimorfisma (*AFLP*) analīzi (*Van der Wolf et. al.*, 1998).

7.3. *PCR* metodes

Īpašos PCR praimerus (*Pastrik et.al.*, 2002; sk. 6. papildinājumu) var izmantot, lai diferencētu *R. solanacearum* celmus, kas pieder 1. iedalījumam (3., 4. un 5. biovars) un 2. iedalījumam (1., 2.A un 2.T biovars), kas sākotnēji definēti ar *RFLP* analīzi (*Cook et al.*, 1989) un 16S rDNA sekvenēšanu (*Taghavi et al.*, 1996).

C. *APSTIPRINĀJUMA TESTS*

Patogenitātes tests jāveic *R. solanacearum* diagnozes galīgai apstiprināšanai un kā *R. solanacearum* identificēto kultūru virulences novērtēšanai.

1) No testējamā izolāta 24–48 stundu uzsējuma sagatavot inokulātu, kurā ir aptuveni 10^6 šūnu vienā ml, un sagatavot pozitīvā kontrolparauga *R. solanacearum* celmu (piemēram, *NCPPB* 4156 = *PD* 2762 = *CFBP* 3857; sk. 3. papildinājumu).

2) Inokulēt 5–10 pret slimību ieņēmīgus tomātu vai baklažānu stādus trešās īstās lapas fāzē (sk. VI iedaļas A.9. punktu).

3) Līdz divām nedēļām inkubēt 25–28 °C temperatūrā, augstā relatīvajā gaisa mitrumā un laistīt, lai novērstu ūdens izsīkšanu vai auga novīšanu ūdens trūkuma dēļ. Ar tīrkultūru raksturīgo vīti novēro 15 dienu laikā. Ja pēc šī perioda nav inficēšanās pazīmju, kultūru nevar apstiprināt kā *R. solanacearum* patogēno formu.

4) Novērot, vai neparādās vītes un/vai epinastijas, hlorozes simptomi vai aizkavēšanās augšanā.

5) Augus ar inficēšanās pazīmēm izolēt, atdalot stublāja daļu 2 cm virs inokulācijas vietas. Sasmalcināt un suspendēt nelielā daudzumā sterila destilēta ūdens vai 50 mM fosfāta buferšķīduma (4. papildinājums). Izolēt no suspensijas, uzklājot vai uzsējot atšķaidījumu uz atbilstošas barotnes, ieteicams selektīvās barotnes (2. papildinājums), 48–72 stundas inkubēt 28 °C temperatūrā un novērot, vai veidojas *R. solanacearum* raksturīgās kolonijas.

1. papildinājums

Laboratorijas, kas piedalās protokolu optimizācijas un validācijas procesā

Laboratorija (1)	Atrašanās vieta	Valsts
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Vīne un Linca	Austrija
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Beļģija
Plantedirektoratet	Lyngby	Dānija
Central Science Laboratory	Jorka	Anglija
Scottish Agricultural Science Agenncy	Edinburga	Skotija
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	Francija
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Francija
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Vācija
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannovere	Vācija
State Laboratory	Dublina	Īrija
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali	Boloņa	Itālija
Regione Veneto Unità Periferica per i Servizi Fitosanitari	Verona	Itālija
Nederlandse Algemene Keuringsdienst	Emelorda	Nīderlande
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Nīderlande
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lisabona	Portugāle
Centro de Diagnóstico de Aldearrubia	Salamanka	Spānija
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias	Valensija	Spānija
Swedish University of Agricultural Sciences	Upsala	Zviedrija

(1) Zinātnieki kontaktpersonas: sk. tīmekļa vietnē http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

2. papildinājums

Barotnes R. solanacearum izolācijai un audzēšanai

a) **Vispārējas augšanas barotnes**

Barojošais agars (NA)

Barojošais agars (*Difco*)	23,0 g
Destilēts ūdens	1,0 l

Izšķīdināt sastāvdaļas un 15 min sterilizēt autoklāvā 121 °C temperatūrā.

Rauga peptona glikozes agars (YPGA)

Rauga ekstrakts (*Difco*)	5,0 g
Baktopeptons (*Difco*)	5,0 g
D(+) glikoze (monohidrāts)	10,0 g
Baktoagars (*Difco*)	15,0 g
Destilēts ūdens	1,0 l

Izšķīdināt sastāvdaļas un 15 min sterilizēt autoklāvā 121 °C temperatūrā.

Saharozes peptona agars (SPA)

Saharoze	20,0 g
Baktopeptons (*Difco*)	5,0 g
K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,25 g
Baktoagars (*Difco*)	15,0 g
Destilēts ūdens	1,0 l
pH 7,2–7,4	

Izšķīdināt sastāvdaļas un 15 min sterilizēt autoklāvā 121 °C temperatūrā.

Kelmana tetrazola barotne

Kazamīnskābes (*Difco*)	1,0 g
Baktopeptons (*Difco*)	10,0 g
Dekstroze	5,0 g
Baktoagars (*Difco*)	15,0 g
Destilēts ūdens	1,0 l

Izšķīdināt sastāvdaļas un 15 min sterilizēt autoklāvā 121 °C temperatūrā.

Atdzesēt līdz 50 °C un pievienot ar filtrāciju sterilizētu 2,3,5-trifeniltetrazola hlorīda (*Sigma*) šķīdumu, iegūstot galīgo koncentrāciju 50 mg/l.

b) **Validētas selektīvās augšanas barotnes**

SMSA barotne (*Englebrecht*, 1994, *Elphinstone et al.* 1996 modifikācija)

Bazālā barotne	
Kazamīnskābes (*Difco*)	1,0 g
Baktopeptons (*Difco*)	10,0 g
Glicerīns	5,0 ml
Baktoagars (*Difco*); sk. 2. piezīmi	15,0 g
Destilēts ūdens	1,0 l

Izšķīdināt sastāvdaļas un 15 min sterilizēt autoklāvā 121 °C temperatūrā.

Atdzesēt līdz 50 °C un pievienot ar filtrāciju sterilizētu turpmāk minēto sastāvdaļu rezerves šķīdumu ūdenī, lai iegūtu norādītās galīgās koncentrācijas:

Kristālvioletais (*Sigma*)	5 mg/l
Polimiksīna-B-sulfāts(*Sigma* P-1004)	600 000 U (apm. 100 mg)/l
Bacitracīns (*Sigma* B-0125)	1 250 U (apm. 25 mg)/l
Hloramfenikols (*Sigma* C-3175)	5 mg/l
Penicilīns-G (*Sigma* P-3032)	825 U (apm. 0,5 mg)/l
2,3,5-trifeniltetrazola hlorīds (*Sigma*)	50 mg/l

Piezīme:

1. Citu, iepriekš neminētu reaģentu izmantošana var kavēt *R. solanacearum* augšanu.
2. Baktoagara (*Difco*) vietā var izmantot *Oxoid Agar #1*. Tādā gadījumā *R. solanacearum* augšana notiks lēnāk, lai gan var ierobežot arī konkurējošo saprofītu augšanu. Tipiskas *R. solanacearum* kolonijas var izveidoties par 1–2 dienām vēlāk, un sārtais iekrāsojums var būt gaišāks un difūzāks nekā uz baktoagara.
3. Bacitracīna koncentrācijas palielināšana līdz 2 500 U/l var samazināt konkurējošo baktēriju populācijas, neietekmējot *Ralstonia solanacearum* augšanu.

Barotņu un antibiotiku rezerves šķīdumus glabā tumsā 4 °C temperatūrā, tie jāizlieto viena mēneša laikā.

Pirms izmantošanas uz platēm nedrīkst būt virsmas kondensāta.

Nedrīkst pieļaut pārmērīgu plates izžūšanu.

Pēc katras jaunas barotņu partijas sagatavošanas veic kvalitātes kontroli, uzsējot *R. solanacearum* references kultūras suspensiju (sk. 3. papildinājumu) un novērojot, vai pēc 2–5 dienu inkubācijas 28 °C temperatūrā veidojas tipiskas kolonijas.

c) **Validēta bagātināšanas barotne**

SMSA barotne (Elphinstone et al., 1996)

Sagatavo tāpat kā *SMSA* selektīvo agara barotni, bet nepievieno baktoagaru un 2,3,5-tetrazola hlorīdu.

Modificēta Wilbrink barotne (*Caruso et al.*, 2002)

Saharoze	10 g
Proteāzes peptons	5 g
K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4$	0,25 g
$NaNO_3$	0,25 g
Destilēts ūdens	1 l

Sterilizēt 15 min autoklāvā 121 °C temperatūrā un atdzesēt līdz 50 °C.

Pievieno antibiotiku rezerves šķīdumus tāpat kā *SMSA* barotnei.

3. papildinājums

A. **Tirdzniecībā pieejami standartizēti kontroles materiāli**

a) *Baktēriju izolāti*

Šādus bakteriālos izolātus ir ieteicams izmantot kā standarta references materiālu vai kā pozitīvos kontrolparaugus (1. tabula), vai testu optimizācijas laikā, lai izvairītos no nespecifiskas reakcijas (2. tabula). Visi minētie celmi ir pieejami tirdzniecībā no šādiem uzņēmumiem:

1. National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPPB), Centrālā zinātniskā laboratorija, Jorka, Apvienotā Karaliste

2. Culture Collection of the Plant Protection Service (PD), Wageningen, Nīderlande

3. Collection française de bactéries phytopathogènes (CFBP) – INRA Station phytobactériologie, Angers, Francija

1. tabula. SMT *R. solanacearum* references izolātu saraksts

NCPPB kods	SMT #	Citi kodi	Izcelsmes valsts	Biovars
NCPPB 4153	6	CFBP 4582, Pr 3020, EURS11	Ēģipte	2
NCPPB 4154	10	CFBP 4585, 550, EURS21	Turcija	2
NCPPB 3857	12	CFBP 4587, Pr 1140, EURS26	Anglija	2
NCPPB 1584	23	CFBP 4598, EURS49	Kipra	2
NCPPB 2505	24	CFBP 4599, EURS50	Zviedrija	2
NCPPB 4155	26	CFBP 4601, 502, EURS55	Beļģija	2
NCPPB 4156 (*)	71 (*)	PD 2762, CFBP 3857	Nīderlande	2
NCPPB 4157	66	LNPV 15.59	Francija	2
NCPPB 4158	39	CFBP 4608, Port 448, EURS80	Portugāle	2
NCPPB 4160	69	IVIA-1632-2	Spānija	2
NCPPB 4161	76	B3B	Vācija	2
NCPPB 325	41	CFBP 2047, KEL60-1, R842	ASV	1
NCPPB 3967	42	CFBP 4610, R285, GONg7	Kostarika	1
NCPPB 4028	43	CFBP 4611, R303/571, CIP310, SEQ205	Kolumbija	2
NCPPB 3985	44	CFBP 4612, R578, CIP312	Peru	2T
NCPPB 3989	45	CFBP 4613, R568, CIP226	Brazīlija	2T
NCPPB 3996	46	CFBP 3928, R276/355, CIP72, SEQ225	Peru	3
NCPPB 3997	47	CFBP 4614, R280/363, CIP49, HAY0131a	Austrālija	3
NCPPB 4029	48	CFBP 4615, R297/349, CIP121, CMIb2861	Šrilanka	4
NCPPB 4005	49	CFBP 4616, R470	Filipīnas	4
NCPPB 4011	50	CFBP 4617, R288, HEmps2	Ķīna	5

(*) Izmanto par standarta references celmu *R. solanacearum* 2. biovaram (3. rase).

Piezīme: Augstākminēto celmu autentiskumu var garantēt vienīgi tad, ja tie iegūti no autentiskas kultūru kolekcijas.

2. tabula. Noteikšanas testu optimizēšanai paredzēto SMT seroloģiski vaiģenētiski saistīto references baktēriju saraksts

NCPPB kods	SMT #	Citi kodi	Identifikācija
NCPPB 4162	51	CFBP 1954	*Bacillus polymyxa* (1)
NCPPB 4163	52	CFBP 1538	*Pseudomonas marginalis pv. marginalis* (1)
NCPPB 4164	—	CFBP 2227	*Burkholderia cepacia* (2)
NCPPB 4165	—	CFBP 2459	*Ralstonia pickettii* (2)
NCPPB 4166	58	CFBP 3567 CSL Pr1150	*Ralstonia pickettii* (1)
NCPPB 4167	60	CFBP 4618 PD 2778	*Ralstonia* sp. (1)
NCPPB 1127	53	CFBP 3575	*Burkholderia andropogonis* (1)
NCPPB 353	54	CFBP 3572	*Burkholderia caryophylli* (1)
NCPPB 945	55	CFBP 3569	*Burkholderia cepacia* (1)
NCPPB 3708	56	CFBP 3574	*Burkholderia glumae* (1)
NCPPB 3590	57	CFBP 3573	*Burkholderia plantarii* (1)
NCPPB 3726	59	CFBP 3568	*Banana Blood Disease Bacterium* (1) (2) (3)
NCPPB 4168	61	CFBP 4619 IPO S339	*Enterobacter* sp. (1)
NCPPB 4169	62	IPO 1695	*Enterobacter* sp. (1)
NCPPB 4170	63	CFBP 4621 IPO S306	*Ochrobactrum anthropi* (1) (2)
NCPPB 4171	64	CFBP 4622 IPO 1693	*Curtobacterium* sp. (1) (2)
NCPPB 4172	65	IPO 1696a	*Pseudomonas* sp. (1)
NCPPB 4173	—	PD 2318	*Aureobacterium* sp. (2)
NCPPB 4174	81	IVIA 1844,06	*Flavobacterium* sp. (1) (2)

(1) Potenciāli nespecifiski reaģējošie celmi (*IF* un/vai *ELISA*) ar poliklonālu imūnserumu, ko izmanto seroloģiskajiem testiem.
(2) Celms, no kā dažās laboratorijās var iegūt *PCR* produktu, kura izmērs ir līdzīgs paredzamajam izmēram, lietojot īpašus praimerus *OLI-1* un *Y-2* (sk. 6. papildinājumu).
(3) Varētu notikt nespecifiska reakcija, bet tā novērota tikai uz banāniem Indonēzijā.

b) *Tirdzniecībā pieejami standartizēti kontroles materiāli*

No *NCPPB* kultūru kolekcijas pieejami šādi standarta kontroles materiāli:

Liofilizēts kartupeļu ekstrakta koncentrāts, kas iegūts no 200 veseliem kartupeļu bumbuļiem, ko izmanto kā negatīvo kontrolparaugu visiem testiem.

Liofilizēts kartupeļu ekstrakta koncentrāts no 200 veseliem kartupeļu bumbuļiem, kas satur 10^3–10^4 un 10^4–10^6 *R. solanacearum* 2. biovara šūnu (*NCPPB* 4156 = *PD* 2762 = *CFBP* 3857 celms), kuru izmanto par pozitīvo kontrolparaugu seroloģiskajiem un *PCR* testiem. Tā kā šūnu dzīvotspēju ietekmē liofilizēšana, tas nav piemērots izmantošanai kā standarta kontrolparaugs izolācijas vai biopatogenitātes testiem.

Ar formalīnu fiksētas *R. solanacearum* 2. biovara suspensijas (*NCPPB* 4156 = *PD* 2762 = *CFBP* 3857 celms), kas satur 10^6 šūnu vienā ml, izmanto kā seroloģisko testu pozitīvos kontrolparaugus.

B. **Pozitīvo un negatīvo kontrolparaugu sagatavošana svarīgākajiem skrīninga testiem PCR/IF un FISH**

Sagatavot *R. solanacearum* 3. rases/2. biovara virulentā celma 48 stundu uzsējumu (piemēram, *NCPPB* 4156 = *PD* 2762 = *CFBP* 3857 celmu) uz *SMSA* bazālās barotnes un suspendēt 10 mM fosfātšķīduma, lai iegūtu šūnu koncentrāciju aptuveni $2x10^8$ kolonijās veidojošo vienību uz ml. Tā parasti ir viegli duļķaina suspensija ar optisko blīvumu 0,15 pie 600 nm.

Atdalīt stolona pamatnes šķirnes ar baltu apvalku 200 kartupeļu bumbuļiem, kas ņemti no tādas partijas, par kuru ir zināms, ka tā nav inficēta ar *R. solanacearum*.

Apstrādāt stolona pamatnes kā parasti, un ekstrakta koncentrātu atkārtoti suspendēt 10 ml.

Sagatavot 10 sterilas 1,5 ml mikromēģenes ar 900 µl atkārtoti suspendēta ekstrakta koncentrāta.

Pārnest 100 µl *R. solanacearum* suspensijas pirmajā mikromēģenē. Samaisīt.

Noteikt inficēšanās decimāllīmeņus, turpinot atšķaidīt nākamajās piecās mikromēģenēs.

Sešas inficētās mikromēģenes tiks izmantotas kā pozitīvie kontrolparaugi. Četras mikromēģenes, kas nav inficētas, tiks izmantotas kā negatīvie kontroltesti. Mikromēģenes attiecīgi marķēt.

Sagatavot 100 µl alikvotas 1,5 ml mikromēģenēs, tādējādi iegūstot 9 katra kontrolparauga reprodukcijas. Līdz izmantošanai glabāt – 16 līdz – 24 °C temperatūrā.

R. solanacearum klātbūtni un daudzumu kontrolparaugos vispirms jāapstiprina ar *IF* testu.

PCR testam veikt DNS ekstrakciju no pozitīvajiem un negatīvajiem kontrolparaugiem katrā testa paraugu sērijā.

IF un *FISH* testu veikt biopatogenitātes testu pozitīvajiem un negatīvajiem kontrolparaugiem katrā testa paraugu sērijā.

IF, FISH un *PCR* biopatogenitātes testiem pozitīvajos kontrolparaugos obligāti jākonstatē vismaz 10^6 un 10^4 *R. solanacearum* šūnas/ml, un tās nedrīkst būt nevienā negatīvajā kontrolpraugā.

4. papildinājums

Buferšķīdumi testu procedūrām

VISPĀRĪGS NORĀDĪJUMS: sterilus buferšķīdumus neatvērtā veidā var glabāt ne ilgāk par vienu gadu.

1. **Buferšķīdumi ekstrakcijas procedūrai**

1.1. Ekstrakcijas buferšķīdums (50 mM fosfāta buferšķīdumus, pH 7,0)

Šo buferšķīdumu izmanto baktēriju ekstrakcijai no augu audiem ar homogenizācijas vai kratīšanas metodi.

Na_2HPO_4 (bezūdens)	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
Destilēts ūdens	1,00 l

Izšķīdināt sastāvdaļas, pārbaudīt pH un 15 min sterilizēt autoklāvā 121 °C temperatūrā.

Papildu komponentus var lietot šāda veidā:

	Mērķis	*Daudzums (uz l)*
Lubrola pārslas	Deflokulants (*)	0,5 g
DC silikona pretputu līdzeklis	Pretputošanas līdzeklis (*)	1,0 ml
Tetranātrija pirofosfāts	Antioksidants	1,0 g
Polivinilpirolidons-40000 (*PVP*- 40)	*PCR* inhibitoru saistīšana	50 g

(*) Izmantošanai ar homogenizācijas ekstrakcijas metodi.

1.2. Nogulšņu buferšķīdums (10 mM fosfāta buferšķīdums, pH 7,2)

Šo buferšķīdumu izmanto kartupeļu bumbuļu stolona pamatņu ekstrakta atkārtotai suspendēšanai un atšķaidīšanai pēc tā koncentrēšanas ar centrifugēšanas metodi.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,4 g
Destilēts ūdens	1,0 l

Izšķīdināt sastāvdaļas, pārbaudīt pH un 15 min sterilizēt autoklāvā 121 °C temperatūrā.

2. **IF testa buferšķīdumi**

2.1. *IF* buferšķīdums (10 mM fosfātbuferēts nātrija hlorīda fizioloģiskais šķīdums, (PBS) pH 7,2)

Šo buferšķīdumu izmanto antivielu atšķaidīšanai.

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

Izšķīdināt sastāvdaļas, pārbaudīt pH un 15 min sterilizēt autoklāvā 121 °C temperatūrā.

2.2. *IF-Tween* buferšķīdums

Šo buferšķīdumu izmanto priekšmetstikliņu skalošanai.

Pievienot *IF* buferšķīdumam 0,1 % *Tween 20*.

2.3. Fosfātbuferēts glicerīns, pH 7,6

Šo buferšķīdumu izmanto kā histoloģisko šķīdumu *IF* priekšmetstikliņa lodziņos fluorescences veicināšanai.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	3,2 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,15 g
Glicerīns	50 ml
Destilēts ūdens	100 ml

Krāsojuma noturīgumu sekmējoši histoloģiskie šķīdumi ir pieejami arī tirdzniecībā, piemēram, *Vectashield® (Vector Laboratories)* vai *Citifluor® (Leica)*.

3. **Buferšķīdumi netiešajam ELISA testam**

3.1. Divkāršs pārsedzošais buferšķīdums, pH 9,6

Na_2CO_3	6,36 g
$NaHCO_3$	11,72 g
Destilēts ūdens	1,00 l

Izšķīdināt sastāvdaļas, pārbaudīt pH un 15 min sterilizēt autoklāvā 121 °C temperatūrā.

Kā antioksidantu var pievienot nātrija sulfītu (0,2 %), ja nepieciešams aizkavēt oksidēto aromātisko savienojumu veidošanos.

3.2. Desmitkārtīgs fosfāta buferšķīdums (PBS), pH 7,4

NaCl	80,0 g
KH_2PO_4	2,0 g
$Na_2HPO_4.12H_2O$	29,0 g
KCl	2,0 g
Destilēts ūdens	1,0 l

3.3. *Tween* buferšķīdums

10X PBS	100 ml
10 % *Tween* 20	5 ml
Destilēts ūdens	895 ml

3.4. Bloķējošais (antivielu) buferšķīdums (jābūt svaigi gatavotam).

10X PBS	10,0 ml
Polivinilpirolidons-44000 (*PVP*-44)	2,0 g
10 % *Tween* 20	0,5 ml
Sausais piens	0,5 g
Destilēts ūdens	atšķaida līdz 100 ml

3.5. Sārmainais fosfatāzes substrāta šķīdums pH 9,8

Dietanolamīns	97 ml
Destilēts ūdens	800 ml

Samaisīt un ar koncentrētu HCl koriģēt pH vērtību, līdz tā sasniedz 9,8.

Atšķaida ar ūdeni līdz 1 litram.

Pievieno 0,2 g $MgCl_2$.

Uz 15 ml šķīduma izšķīdina 2 fosfatāzes substrāta 5 mg tabletes (*Sigma*).

4. **Buferšķīdumi DASI ELISA testam**

4.1. Nosedzošais buferšķīdums, pH 9,6

Na_2CO_3	1,59 g
$NaHCO_3$	2,93 g
Destilēts ūdens	1 000 ml

Izšķīdina sastāvdaļas un pārbauda pH 9,6.

4.2. Desmitkārtīgs fosfāta buferšķīdums (PBS), pH 7,2–7,4

NaCl	80,0 g
$NaH_2PO_4.2\ H_2O$	4,0 g
$Na_2HPO_4.12H_2O$	27,0 g
Destilēts ūdens	1 000 ml

4.3. *Tween* buferšķīdums

10X PBS	50 ml
10 % *Tween* 20	5 ml
Destilēts ūdens	950 ml

4.4. Buferšķīduma substrāts, pH 9,8

Dietanolamīns	100 ml
Destilēts ūdens	900 ml

Samaisīt un ar koncentrētu HCl koriģēt pH vērtību, līdz tā sasniedz 9,8.

5. papildinājums

Inficēšanās līmeņa noteikšana ar IF un FISH testiem

1. Saskaitīt raksturīgi fluorescējošo šūnu vidējo skaitu vienā redzes laukā (c).

2. Aprēķināt raksturīgi fluorescējošo šūnu skaitu vienā mikroskopa lodziņā (C).

$C = c \times S/s,$

kur S = daudzlogu priekšmetstikliņa viena lodziņa virsmas laukums

un s = objektīva lauka virsmas platība

$s = \pi i^2/4G^2K^2,$ kur i = lauka koeficients (atkarībā no okulāra tipa tas var būt robežās no 8 līdz 24)

K = mēģenes koeficients (1 vai 1,25),

G = objektīva palielinājums (100x, 40x utt.).

3. Aprēķināt raksturīgi fluorescējošo šūnu skaitu vienā mililitrā atkārtoti suspendēta ekstrakta koncentrāta (N).

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

kur y = atkārtoti suspendētā ekstrakta koncentrāta daudzums katrā lodziņā

un F = atkārtoti suspendētā ekstrakta koncentrāta atšķaidījuma pakāpe

6. papildinājums

Validēts PCR protokols un reaģenti

Piezīme: Iepriekšējai orientējošai pārbaudei ar šo metodi jānodrošina reproducējama noteikšana 10^3 līdz 10^4 *R. solanacearum* šūnas uz 1 ml parauga ekstrakta.

Iepriekšējā orientējošā pārbaudē nedrīkst iegūt šķietami pozitīvus testa rezultātus ar baktēriju references celmiem (sk. 3. papildinājumu).

1. **Seal *et al.* PCR protokols (1993)**

1.1. Oligonukleotīda praimeri

Augšupejošais praimers *OLI*-1 5′-GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC-3′

Apgrieztais praimers *Y*-2 5′-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3′

No *R. solanacearum* DNS matricas sagaidāmā amplikona izmērs = 288 bp

1.2. PCR reakcijas maisījums

Reaģents	Reaģenta daudzums	Galīgā koncentrācija
Sterils ultratīrs ūdens	17,65 µl	
10X buferšķīdums (1) (15 mM $MgCl_2$)	2,5 µl	1X (1,5 mM $MgCl_2$)
dNTP maisījums (20 mM)	0,25 µl	0,2 mM
OLI-1 praimers (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Y-2 praimers (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Taq polimerāze (5 U/µl) (1)	0,1 µl	0,5 U
Parauga tilpums	2,0 µl	
Kopējais tilpums	25 µl	

(1) Metode validēta, izmantojot *Taq* polimerāzi no *Perkin Elmer (AmpliTaq)* un *Gibco BRL*.

1.3. *PCR* reakcijas apstākļi

Veikt šādu programmu:

1 ciklu:	i)	2 minūtes 96 °C temperatūrā (DNS matricas denaturēšana)
35 ciklus:	ii)	20 sekundes 94 °C temperatūrā (DNS matricas denaturēšana)
	iii)	20 sekundes 68 °C temperatūrā (praimeru rūdīšana)
	iv)	30 minūtes 72 °C temperatūrā (atkārtojumu paplašināšana)
1 ciklu:	v)	10 minūtes 72 °C temperatūrā (galīgā paplašināšana)
	vi)	turēt 4 °C temperatūrā

Piezīme: Šī programma tika optimizēta izmantošanai ar *Perkin Elmer* 9600 termokameru. Izmantojot citiem modeļiem, iespējams, ka jāmaina ii), iii) un iv) cikla ilguma solis.

1.4. Amplikona restriktāzes analīze

PCR produkti, kas pavairoti no *R. solanacearum* DNS, veido atšķirīgu restrikcijas fragmentu garuma polimorfismu ar fermentu *Ava* II pēc inkubācijas 37 °C temperatūrā.

2. **Pastrik un Maiss (2000) PCR protokols**

2.1. Oligonukleotīda praimeri

Augšupejošais praimers Ps-1 5′-agt cga acg gca gcg ggg g-3′

Apgrieztais praimers Ps-2 5′-ggg gat ttc aca tcg gtc ttg ca-3′

no *R. solanacearum* DNS matricas sagaidāmā amplikona izmērs = 553 bp

2.2. *PCR* reakcijas maisījums

Reaģents	Reakcijas daudzums	Galīgā koncentrācija
Sterils ultratīrs ūdens	16,025 µl	
10X PCR buferšķīdums (1)	2,5 µl	1X (1,5 mM $MgCl_2$)
BSA (V frakcija) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
d-nTP maisījums (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Ps-1 praimers (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Ps-2 praimers (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Taq polimerāze (5 U/µl) (1)	0,1 µl	0,5 U
Parauga daudzums	5,0 µl	
Kopējais daudzums	25,0 µl	

(1) Metodes validētas, izmantojot *Taq* polimerāzi no *Perkin Elmer (AmpliTaq)* un *Gibco BRL*.

NB: Sākotnēji optimizētas izmantošanai ar *MJ Research PTC 200* termokameru ar *Gibco Taq* polimerāzi. Tādās pašās koncentrācijās var izmantot arī *Perkin Elmer AmpliTaq* un buferšķīdumu.

2.3. *PCR* reakcijas apstākļi

Veikt šādu programmu:

1 ciklu:	i)	5 minūtes 95 °C temperatūrā (DNS matricas denaturēšana)
35 ciklus:	ii)	30 sekundes 95 °C temperatūrā (DNS matricas denaturēšana)
	iii)	30 sekundes 68 °C temperatūrā (praimeru rūdīšana)
	iv)	45 minūtes 72 °C temperatūrā (atkārtojumu paplašināšana)
1 ciklu:	v)	5 minūtes 72 °C temperatūrā (galīgā paplašināšana)
	vi)	turēt 4 °C temperatūrā

Piezīme: Šī programma ir optimizēta izmantošanai ar *MJ Research PTC* 200 termokameru. Izmantojot citiem modeļiem, iespējams, ka jāmaina ii), iii) un iv) cikla ilguma solis.

2.4. Amplikona restriktāzes analīze

PCR produkti, kas pavairoti no *R. solanacearum* DNS, veido atšķirīgu restrikcijas fragmentu garuma polimorfismu ar fermentu *Taq* I pēc 30 min inkubācijas 65 °C temperatūrā. No *R. solanacearum* iegūto restrikcijas fragmentu raksturīgais izmērs ir 457 bp un 96 bp.

3. **Daudzkārtējas PCR protokols ar PCR iekšējo kontroli (Pastrik *et al.*, 2002)**

3.1. Oligonukleotīda praimeri

Augšupejošas praimers *Rs-1-F* 5′-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3′

Apgrieztais praimers *Rs-1-R* 5′-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3′

Augšupejošais praimers *Ns-5-F* 5′-AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G-3′

Apgrieztais praimers *Ns-6-R* 5′-GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC-3′

No *R. solanacearum* DNS matricas sagaidāmā amplikona izmērs = 718 bp (*RS* praimeru komplekts).

No 18S *rRNA PCR* sagaidāmā iekšējās kontroles amplikona izmērs = 310 bp (*NS* praimeru komplekts).

3.2. *PCR* reakcijas maisījums

Reaģents	Reaģenta daudzums	Galīgā koncentrācija
Sterils ultratīrs ūdens	12,625 µl	
10X *PCR* buferšķīdums (1) (15 mM $MgCl_2$)	2,5 µl	1X (1,5 mM $MgCl_2$)
BSA (V frakcija) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
d-nTP maisījums (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Praimers *RS-1-F* (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Praimers *RS-1-R* (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Praimers *NS-5-F* (10 µM) (2)	0,15 µl	0,06 µM
Praimers *NS-6-R* (10 µM) (2)	0,15 µl	0,06 µM
Taq polimerāze (5 U/µl) (1)	0,2 µl	1,0 U
Parauga tilpums	5,0 µl	
Kopējais tilpums	25,0 µl	

(1) Metodes validētas, izmantojot *Taq* polimerāzi no *Perkin Elmer (AmpliTaq)* un *Gibco BRL*.

(2) *NS-5-F* un *NS-6-R* praimeru koncentrācija kartupeļu stolona pamatņu ekstrakcijai optimizēta, izmantojot homogenizācijas metodi un DNS attīrīšanu ar *Pastrik* (2000) metodi (sk. VI iedaļas 6.1.a) punktu). Reaģentu koncentrācijas atkārtota optimizācija ir nepieciešama, ja izmanto ekstrakciju ar kratīšanas metodi vai citu DNS izolācijas metodi.

3.3. *PCR* reakcijas apstākļi

Veikt šādu programmu:

1 ciklu:	i)	5 minūtes 95 °C temperatūrā (DNS matricas denaturēšana)
35 ciklus:	ii)	30 sekundes 95 °C temperatūrā (DNS matricas denaturēšana)
	iii)	30 sekundes 58 °C temperatūrā (praimeru rūdīšana)
	iv)	45 minūtes 72 °C temperatūrā (atkārtojumu paplašināšana)
1 ciklu:	v)	5 minūtes 72 °C temperatūrā (galīgā paplašināšana)
	vi)	turēt 4 °C temperatūrā

Piezīme: Šī programma ir optimizēta izmantošanai ar *MJ Research PTC* 200 termokameru. Izmantojot citiem modeļiem, iespējams, ka jāmaina ii), iii) un iv) cikla ilguma solis.

3.4. Amplikona restriktāzes analīze

PCR produkti, kas pavairoti no *R. solanacearum* DNS, veido atšķirīgu restrikcijas fragmentu garuma polimorfismu ar fermentu *Bsm* I vai *Isoschizomere* (piemēram, *Mva* 1269 I) pēc 30 min inkubācijas 65 °C temperatūrā.

4. ***R. solanacearum*** **biovarspecifiskais PCR protokols (Pastrik *et al.*, 2001)**

4.1. Oligonukleotīda praimeri

Augšupejošais praimers *Rs-1-F* 5′-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3′

Lejupejošais praimers *Rs-1-R* 5′-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3′

Lejupejošais praimers *Rs-3-R* 5′-TTC ACG GCA AGA TCG CTC-3′

Paredzamais amplikona izmērs no *R. solanacearum* DNS matricas:

ar *Rs*-1-*F*/*Rs*-1-*R* = 718 bp,

ar *Rs*-1-*F*/*Rs*-3-*R* = 716 bp.

4.2. *PCR* reakcijas maisījums

a) 1./2. biovarspecifiskā *PCR*

Reaģents	Reaģenta daudzums	Galīgā koncentrācija
Sterils ultratīrs ūdens	12,925 µl	
10X PCR buferšķīdums (1)	2,5 µl	1X (1,5 mM $MgCl_2$)
BSA (V frakcija) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
d-NTP maisījums (20mM)	0,125 µl	0,1 mM
Praimers *Rs-1-F* (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Praimers *Rs-1-R* (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Taq polimerāze (5 U/µl) (1)	0,2 µl	1 U
Parauga tilpums	5,0 µl	
Kopējais tilpums	25,0 µl	

(1) Metodes validētas, izmantojot *Taq* polimerāzi no *Perkin Elmer (AmpliTaq)* un *Gibco BRL*.

b) 3./4./5. biovarspecifiskā *PCR*

Reaģents	Reaģenta daudzums	Galīgā koncentrācija
Sterils ultratīrs ūdens	14,925 µl	
10X *PCR* buferšķīdums (1)	2,5 µl	1X (1,5 mM $MgCl_2$)
BSA (V frakcija) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
dNTP maisījums (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Praimers *Rs-1-F* (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Praimers *Rs-3-R* (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Taq polimerāze (5 U/µl) (1)	0,2 µl	1 U
Parauga tilpums	5,0 µl	
Kopējais tilpums	25,0 µl	

(1) Metodes validētas, izmantojot *Taq* polimerāzi no *Perkin Elmer (AmpliTaq)* un *Gibco BRL*.

4.3. *PCR* reakcijas apstākļi

Veikt šādu programmu gan 1./2. biovaram, gan 3./4./5. biovaram specifiskajām reakcijām:

1 ciklu:	i)	5 minūtes 95 °C temperatūrā (DNS matricas denaturēšana)
35 ciklus:	ii)	30 sekundes 95 °C temperatūrā (DNS matricas denaturēšana)
	iii)	30 sekundes 58 °C temperatūrā (praimeru rūdīšana)
	iv)	45 minūtes 72 °C temperatūrā (atkārtojumu paplašināšana)
1 ciklu:	v)	5 minūtes 72 °C temperatūrā (galīgā paplašināšana)
	vi)	tur 4 °C temperatūrā

Piezīme: Šī programma ir optimizēta izmantošanai ar *MJ Research PTC* 200 termokameru. Izmantojot citiem modeļiem, iespējams, ka jāmaina ii), iii) un iv) cikla ilguma solis.

4.4. Amplikona restriktāzes analīze

PCR produkti, kas pavairoti no *R. solanacearum* DNS, izmantojot *Rs*-1-*F* un *Rs*-1-*R*, veido atšķirīgu restrikcijas fragmentu garuma polimorfismu ar fermentu *Bsm* I vai *Isoschizomere* (piemēram, *Mva* 1269 I) pēc 30 min ilgas inkubācijas 65 °C temperatūrā. *PCR* produktiem, kas pavairoti no *R. solanacearum* DNS izmantojot praimerus *Rs*-1-*F* un *Rs*-3-*R*, nav restrikcijas vietu.

5. **Papildinājuma buferšķīduma pagatavošana**

5.1. Bromfenolzilais (10 % **rezerves šķīdums**)

Bromfenolzilais	5 g
Bidestilēts ūdens	50 ml

5.2. Papildinājuma buferšķīdums

Glicerīns (86 %)	3,5 ml
Bromfenolzilais (5.1.)	300 µl
Bidestilēts ūdens	6,2 ml

6. **10X tris-acetāt-EDTA (TAE) buferšķīdums, pH 8,0**

Tris buferšķīdums	48,40 g
Ledus etiķskābe	11,42 ml
EDTA (dinātrija sāls)	3,72 g
Destilēts ūdens	1,00 l

Pirms lietošanas atšķaidīt līdz 1X.

Pieejams arī tirdzniecībā (piemēram, *Invitrogen* vai līdzvērtīgs).

7. papildinājums

Validētie reaģenti FISH testam

1. **Oligozondes**

R. solanacearum specifiskā zonde *OLI-1-CY3*: 5′-ggc agg tag caa gct acc ccc-3′

nespecifisko eubaktēriju zonde *EUR-338-FITC*: 5′-gct gcc tcc cgt agg agt-3′

2. **Fiksējošais šķīdums**

[UZMANĪBU! FIKSĒJOŠAIS ŠĶĪDUMS SATUR PARAFORMALDEHĪDU, KAS IR TOKSISKS. LIETOT CIMDUS UN NEIEELPOT. IETEICAMS STRĀDĀT VELKMES SKAPĪ.]

i) Uzkarsēt 9 ml molekulāras tīrības klases ūdens (piemēram, ultratīru ūdeni (*UPW*)) līdz aptuveni 60 °C un pievienot 0,4 g paraformaldehīda. Paraformaldehīds izšķīst pēc tam, kad tam pievieno 5 pilienus 1N NaOH, maisot ar magnētisko maisītāju.

ii) Noregulēt pH līdz 7,0, pievienojot 0,1M fosfāta buferšķīduma (*PB*, pH 7,0) un 5 pilienus 1N HCl. Pārbaudīt pH ar indikatorpapīru, un, ja nepieciešams, koriģēt ar HCl vai NaOH. *[UZMANĪBU! NEIZMANTOT PH-METRU ŠĶĪDUMOS, KAS SATUR PARAFORMALDEHĪDU.]*

iii) Filtrēt šķīdumu caur 0,22 μm membrānfiltru un sargāt no putekļiem, turēt 4 °C temperatūrā līdz turpmākai izmantošanai.

3. **3X hibridizācijas maisījums**

NaCl	2,7 M
Tris-HCl	60 mM (pH 7,4)
EDTA (sterilizēts ar filtrēšanu un autoklavēts)	15 mM

Ja nepieciešams, atšķaidīt līdz 1X.

4. **Hibridizācijas šķīdums**

1X hibridizācijas maisījums	
Nātrija dodecilsulfāts (SDS)	0,01 %
Formamīds	30 %
Zonde EUB 338	5 ng/μl
Zonde OLI-1 vai OLI-2	5 ng/μl

Sagatavot hibridizācijas šķīduma daudzumus saskaņā ar 1. tabulu. Katram priekšmetstikliņam (kas satur divus dažādus paraugus un to dublikātus) nepieciešami 90 μl hibridizācijas šķīduma. *JĀATCERAS: FORMAMĪDS IR ĪPAŠI TOKSISKS, IZMANTOJIET CIMDUS UN VEICIET VISUS NEPIECIEŠAMOS DROŠĪBAS PASĀKUMUS!*

1. Tabula. Ieteicamie daudzumi hibridizācijas maisījuma pagatavošanai

Priekšmetstikliņu skaits:	1	4	6	8	10
Sterils ultratīrs ūdens	23,1	92,4	138,6	184,8	231,0
3x hibridizācijas maisījums	30,0	120,0	180,0	240,0	300,0
1 % *SDS*	0,9	3,6	5,4	7,2	9,0
Formamīds	27,0	108,0	162,0	216,0	270,0
Zonde *EUB 338* (100 ng/μl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Zonde OLI-1 vai OLI-2 (100 ng/μl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Kopējais tilpums (μl)	90,0	360,0	540,0	720,0	900,0

Piezīme: Visus šķīdumus, kas satur gaismjutīgas oligozondes, uzglabāt tumsā – 20 °C temperatūrā. Izmantošanas laikā sargāt no tiešas saules vai elektriskās gaismas.

5. **0,1M fosfāta buferšķīdums, pH 7,0**

Na_2HPO_4	8,52 g
KH_2PO_4	5,44 g
Destilēts ūdens	1,00 l

Izšķīdināt sastāvdaļas, pārbaudīt pH un sterilizēt 15 min autoklāvā 121 °C temperatūrā.

8. papildinājums

Baklažānu un tomātu kultūra

Iesēt tomātu (*Lycopersicon esculentum*) vai baklažānu (*Solanum melongena*) sēklas pasterizētā kompostā. Stādus ar pilnībā attīstītām dīgļlapām (pēc 10–14 dienām) pārstādīt pasterizētā kompostā podos.

Baklažāna vai tomātu augus pirms inokulācijas audzē siltumnīcā ar šādiem vides apstākļiem:

dienas ilgums:	14 stundas vai dabīgs dienas ilgums, ja ilgāks;
temperatūra:	dienā: 21 līdz 24 °C; naktī: 14 līdz 18 °C.
Ieņēmīga tomātu šķirne:	"Moneymaker"
Ieņēmīga baklažānu šķirne:	"Black Beauty"
Piegādātāji:	sk. http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Amann, R.I., L. Krumholz and D.A. Stahl. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. J. Bacteriol. 172: 762-770.

2. Anon. 1998. Council Directive 98/57/EC of 20 July 1998 on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al*. Official Journal of the European Communities L235, 1-39.

3. Boudazin, G., A.C. Le Roux, K. Josi, P. Labarre and B. Jouan. 1999. Design of division specific primers of *Ralstonia solanacearum* and application to the identification of European isolates. European Journal of Plant Pathology 105; 373-380.

4. Caruso, P., Gorris, M.T., Cambra, M., Palomo, J.L., Collar, J and Lopez, M.M. 2002. Enrichment Double-Antibody Sandwich Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay That Uses a Specific Monoclonal Antibody for sensitive Detection of *Ralstonia solanacearum* in Asymptomatic Potato Tubers. Applied and Environmental Microbiology, 68, 3634-3638.

5. Cook, D., Barlow, E. and Sequeira, L. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. Molecular Plant-Microbe Interactions 1:113-121.

6. Elphinstone, J.G., Hennessy, J., Wilson, J.K. and Stead, D.E. 1996. Sensitivity of detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. EPPO Bulletin 26; 663-678.

7. Englebrecht, M.C. (1994) Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. In: A.C. Hayward (ed.) Bacterial Wilt Newsletter 10, 3-5. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.

8. Hayward, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Applied Bacteriology 27; 265-277.

9. Hayward, A.C., El-Nashaar, H.M., Nydegger, U. and De Lindo, L. 1990. Variation in nitrate metabolism in biovars of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Applied Bacteriology 69; 269-280.

10. Ito, S., Y. Ushijima, T. Fujii, S. Tanaka, M. Kameya-Iwaki, S. Yoshiwara and F. Kishi. 1998. Detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in soil using a semi-selective medium and a PCR technique. J. Phytopathology 146; 379-384.

11. Janse, J.D. (1988) A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 18, 343-351.

12. Janse, J.D. 1991. Infra- and intra-specific classification of *Pseudomonas solanacaerum* strains using whole cell fatty-acid analysis. Systematic and Applied Microbiology 14; 335-345.

13. Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology 44; 693-695.

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

15. Lelliott, R.A. and Stead, D.E. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Blackwell scientific Publications Ltd., Oxford. 216 pp.

16. Lopez, M.M., Gorris, M.T., Llop, P., Cubero, J., Vicedo, B., Cambra, M., 1997. Selective enrichment improves selective isolation, serological and molecular detection of plant pathogenic bacteria. In: H.W. Dehne *et al*., (eds). Klewer Academic Publishers. pp. 117-121.

17. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J., 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic Xanthomonas and Pseudomonas pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. Applied and Environmental Microbiology, 60, 2286-2295.

18. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Phytopathology 85; 528-536.

19. Opina, N., F. Tavner, G. Holloway, J.-F Wang, T.-H Li, R. Maghirang, M. Fegan, A.C. Hayward, V. Krishnapillai, W.F. Hong, B.W. Holloway, J.N. Timmis. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). As Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol. 5; 19-33.

20. Pastrik, K.H. and Maiss, E. 2000. Detection of *R. solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. J. Phytopathology 148; 619-626.

21. Pastrik, K.H., Elphinstone, J.G. and Pukall, R. 2002. Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification of 16S-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control. European Journal of Plant Pathology 108, 831-842.

22. Robinson-Smith, A., Jones, P., Elphinstone, J.G. and Forde, S.M.D. (1995) Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. Food and Agricultural Immunology 7, 67-79.

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

24. Seal, S.E., L.A. Jackson, J.P.W. Young, and M.J. Daniels. 1993. Detection of *Pseudomonas solanacearum, Pseudomonas syzygii, Pseudomonas pickettii* and Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. J. Gen. Microbiol. 139: 1587-1594.

25. Smith, J.J., Offord, L.C., Holderness, M. and Saddler, G.S. 1995. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. Applied and Environmental Microbiology 61; 4262-4268.

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

27. Taghavi, M., Hayward, A.C., Sly, L.I., Fegan, M. 1996. Analysiss of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum, Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. International Journal of Systematic Bacteriology 46; 10-15.

28. Van Der Wolf, J.M., Bonants, P.J.M., Smith, J.J., Hagenaar, M., Nijhuis, E., Van Beckhoven, J.R.C., Saddler, G.S., Trigalet, A., Feuillade, R. 1998. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* Race 3 in Western Europe as determined by AFLP, RC-PFGE and rep-PCR. In: Prior, P., Allen, C. and Elphinstone, J. (eds.) Bacterial wilt disease: Molecular and Ecological Aspects. Springer (Berlin) pp. 44-49.

29. Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N., Stead, D.E. and Boonham, N. 1999. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains using an automated and quantitative flourogenic 5' nuclease TaqMan assay. Applied and Environmental Microbiology 66; 2853-2858.

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

III PIELIKUMS

1. Katrā aizdomu gadījumā par organisma parādīšanos, kam saņemts pozitīvs skrīninga testu rezultāts, izmantojot attiecīgās II pielikumā aprakstītās metodes attiecībā uz uzskaitīto stādāmo materiālu, un visos pārējos gadījumos, un kamēr tiek gaidīts aizdomu apstiprinājums vai noraidījums, jāuzglabā un atbilstoši jāiekonservē šādi materiāli:

   — visi bumbuļi vai augi, no kuriem ņemti paraugi, kad vien tas ir iespējams,

   — visi ekstraktu un papildu materiālu atlikumi, kas gatavoti skrīninga testiem, piemēram, imunofluorescences priekšmetstikliņi,

   un

   — visa attiecīgā dokumentācija, līdz minētās metodes tiek izpildītas līdz galam.

   Ja bumbuļus saglabā, vajadzības gadījumā ir iespējams veikt papildu pārbaudi.

2. Ja ir pozitīvi apstiprināta organisma klātbūtne, jāpatur un attiecīgi jāuzglabā:

   — materiāli, kas minēti 1. punktā,

   un

   — inficētā tomāta vai baklažāna materiāla paraugs, kurā atkarībā no konkrētā gadījuma inokulēts bumbuļu vai augu ekstrakts,

   un

   — organisma izolētā kultūra,

   līdz pagājis vismaz viens mēnesis pēc paziņojuma, kas veikts saskaņā ar 5. panta 2. punktu.

IV PIELIKUMS

5. panta 1. punkta a) apakšpunkta i) daļā minētajai izmeklēšanai atkarībā no konkrētā gadījuma jāietver šādi elementi:

i) audzēšanas vietas:

— kur tiek audzēti vai ir auguši kartupeļi, kam pastāv klonu radniecība ar kartupeļiem, kuros atklāta infekcija ar organismu,

— kur tiek audzēti vai ir auguši tomāti, kas iegūti no tās pašas vietas kā tomāti, kuri inficēti ar organismu,

— kur tiek audzēti vai ir auguši kartupeļi vai tomāti, kas pakļauti oficiālai uzraudzībai, jo pastāv aizdomas par organisma parādīšanos,

— kur tiek audzēti vai ir auguši kartupeļi, kam pastāv klonu radniecība ar kartupeļiem, kuri auguši tādās audzēšanas vietās, kur konstatēta inficēšanās ar organismu,

— kur tiek audzēti kartupeļi vai tomāti un kas atrodas kaimiņos inficētajām audzēšanas vietām, tostarp tādas audzēšanas vietas, kuras lieto vienu ražošanas aprīkojumu un telpas tiešā veidā vai ar kopēja darbuzņēmēja starpniecību,

— kur apūdeņošanai vai laistīšanai tiek izmantoti virszemes ūdeņi no avota, par kuru pastāv aizdomas, ka tas inficējies ar organismu, vai par kuru šādas aizdomas ir apstiprinātas,

— kur apūdeņošanai vai laistīšanai izmantoto virszemes ūdeņu avots ir kopīgs ar tādām audzēšanas vietām, par kurām pastāv aizdomas, ka tās ir inficētas ar organismu, vai par kurām šādas aizdomas ir apstiprinātas,

— kas ir pārplūdušas vai ir bijušas pārplūdušas ar virszemes ūdeņiem, par kuriem pastāv aizdomas, ka tie ir inficēti ar organismu, vai par kuriem šādas aizdomas ir apstiprinātas,

un

ii) virszemes ūdeņi, kuri izmantoti tāda(-u) lauka(-u) vai audzēšanas vietas(-u) apūdeņošanai vai laistīšanai, kurās konstatēta inficēšanās ar organismu, vai kuri tām uzplūduši.

V PIELIKUMS

1. Nosakot iespējamās inficēšanās apmēru saskaņā ar 5. panta 1. punkta a) apakšpunkta iii) daļu un c) apakšpunkta iii) daļu, jāiekļauj šādi elementi:

— uzskaitītais stādāmais materiāls, kas izaudzēts audzēšanas vietā, kura atzīta par inficētu saskaņā ar 5. panta 1. punkta a) apakšpunkta ii) daļu,

— audzēšanas vieta(-as), kur pastāv ražošanas saikne ar uzskaitīto stādāmo materiālu, kas atzīts par inficētu saskaņā ar 5. panta 1. punkta a) apakšpunkta ii) daļu, tostarp audzēšanas vietas, kuras tieši vai ar kopēja darbuzņēmēja starpniecību lieto vienu ražošanas aprīkojumu un telpas,

— uzskaitītais stādāmais materiāls, kas audzēts iepriekšējā ievilkumā minētajā(-ās) audzēšanas vietā(-ās) vai tajā(-ās) atradies laikā, kad uzskaitītais stādāmais materiāls, kas atzīts par inficētu saskaņā ar 5. panta 1. punkta a) apakšpunkta ii) daļu, atradies pirmajā ievilkumā minētajā audzēšanas vietā,

— telpas, kurās noticis darbs ar uzskaitīto stādāmo materiālu no iepriekšējos ievilkumos minētajām audzēšanas vietām,

— visi mehānismi, transportlīdzekļi, trauki, glabātavas vai to daļas un visi pārējie objekti, tostarp saiņošanas materiāls, kas varēja nonākt saskarē ar uzskaitīto stādāmo materiālu, kurš atzīts par inficētu saskaņā ar 5. panta 1. punkta a) apakšpunkta ii) daļu,

— minētais stādāmais materiāls, kas uzglabāts kādā no iepriekšējā ievilkumā uzskaitītajām būvēm vai objektiem vai bijis ar to saskarē, līdz šīs būves un objekti ir iztīrīti un dezinficēti,

— pēc tam, kad ir veikta 5. panta 1. punkta a) apakšpunkta i) daļā minētā apsekošana un testēšana, kartupeļu bumbuļi vai augi, kuriem pastāv vertikāla vai horizontāla klonu radniecība ar uzskaitīto stādāmo materiālu, kas atzīts par inficētu saskaņā ar 5. panta 1. punkta a) apakšpunkta ii) daļu, vai tomātu augi, kas iegūti no tā paša avota kā minētais uzskaitītais stādāmais materiāls, un kuriem inficēšanās iespējama klonu radniecības dēļ, kaut arī testu rezultāti attiecībā uz organisma klātbūtni būtu negatīvi, lai pārbaudītu inficēto bumbuļu vai augu identitāti, var veikt papildus testus,

— iepriekšējā ievilkumā minētā uzskaitītā stādāmā materiāla audzēšanas vieta(-as),

— uzskaitītā stādāmā materiāla audzēšanas vieta(-as), kur apūdeņošanai vai laistīšanai izmantots ūdens, kas atzīts par inficētu saskaņā ar 5. panta 1. punkta c) apakšpunkta ii) daļu,

— uzskaitītais stādāmais materiāls, kas audzēts laukos, kuri pārplūduši ar virszemes ūdeņiem, kas atzīti par inficētiem.

2. Nosakot iespējamo organisma izplatību saskaņā ar 5. panta 1. punkta a) apakšpunkta iv) daļu un c) apakšpunkta iii) daļu, jāņem vērā šādi elementi:

i) attiecībā uz 5. panta 1. punkta a) apakšpunkta iv) daļā minētajiem gadījumiem:

— vai tuvumā neatrodas citas audzēšanas vietas, kur tiek audzēts uzskaitītais stādāmais materiāls,

— sēklas kartupeļu kopīga audzēšana un izmantošana,

— audzēšanas vietas, kur uzskaitītā stādāmā materiāla apūdeņošanai vai laistīšanai izmanto virszemes ūdeņus un kur pastāv vai ir pastāvējuši draudi, ka šie virszemes ūdeņi ir noplūduši vai plūdu veidā nākuši no audzēšanas vietas(-ām), kura(-as) noteiktas par inficētām saskaņā ar 5. panta 1. punkta a) apakšpunkta ii) daļu;

ii) gadījumos, kad virszemes ūdeņi atzīti par inficētiem saskaņā ar 5. panta 1. punkta c) apakšpunkta ii) daļu:

— audzēšanas vieta(-as), kur uzskaitītais stādāmais materiāls tiek audzēts tieši līdzās virszemes ūdeņiem, kuri atzīti par inficētiem, vai kur pastāv risks, ka šādi ūdeņi varētu pārplūst,

— jebkurš slēgts apūdeņošanas baseins, kas saistīts ar virszemes ūdeņiem, kuri atzīti par inficētiem,

— ūdenstilpnes, kas saistītas ar virszemes ūdeņiem, kuri atzīti par inficētiem, ņemot vērā:

— par inficētu atzītā ūdens plūsmas virzienu un ātrumu,

— savvaļā augošu nakteņu dzimtas saimniekaugu esamību.

3. Saskaņā ar 5. panta 2. punkta pirmo apakšpunktu paredzētais paziņojums jāsniedz šādi:

— nekavējoties pēc tam, kas organisma klātbūtne ir apstiprinājusies laboratorijas testu rezultātā, izmantojot metodes, kas minētas II pielikumā; tajā obligāti norādot:

— attiecībā uz kartupeļiem:

a) kartupeļu partijas šķirnes nosaukumu;

b) kartupeļu tipu (galda, sēklas u. c.) un, ja nepieciešams, sēklas kategoriju,

— attiecībā uz tomātu augiem – partijas šķirnes nosaukumu, vajadzības gadījumā, kategoriju,

— neskarot 4. panta 3. punkta prasības par paziņošanu saistībā ar aizdomām par inficēšanos, tā dalībvalsts, kurā organisma klātbūtne ir apstiprināta, ja pastāv risks attiecībā uz tādu uzskaitītā stādāmā materiāla inficēšanos, kas tiek ieviests dalībvalstī vai izvests no tās, nekavējoties paziņo attiecīgajām dalībvalstīm par informāciju, kas jāiesniedz saskaņā ar 5. panta 3. punktu, piemēram:

a) kartupeļu vai tomātu partijas šķirnes nosaukumu;

b) nosūtītāja un saņēmēja vārdu/nosaukumu un adresi;

c) kartupeļu vai tomātu partijas piegādes datumu;

d) piegādātās kartupeļu vai tomātu partijas lielumu;

e) vajadzības gadījumā pievieno augu pases kopiju vai vismaz augu pases numuru, vai ražotāja vai lieltirgotāja reģistrācijas numuru, ja tas nepieciešams, un piegādes paziņojuma kopiju.

Komisija nekavējoties paziņo par šādas informācijas saņemšanu.

4. Saskaņā ar 5. panta 2. punkta otro apakšpunktu paredzētais papildu paziņojums jāsniedz šādi:

kad ir pabeigti visi izmeklējumi un attiecībā uz katru gadījumu norāda:

a) inficēšanās apstiprināšanas datumu;

b) īsu veiktās izmeklēšanas aprakstu, lai identificētu inficēšanas avotu un iespējamo infekcijas izplatīšanos, norādot arī to, kādā apmērā veikta paraugu ņemšana;

c) informāciju par identificētajiem vai iespējamiem inficēšanās avotiem;

d) atzītās inficēšanās līmeņa sīku aprakstu, tostarp ražošanas vietu skaitu un kartupeļu partiju skaitu ar šķirnes norādi, un attiecībā uz sēklas kartupeļiem, to kategoriju;

e) norobežotās zonas sīku aprakstu, tostarp to ražošanas vietu skaitu, kuras nav atzītas par inficētām, bet ir iekļautas attiecīgajā zonā;

f) par inficētu atzītās ūdenstilpnes sīku aprakstu, tostarp ūdens tilpnes nosaukumu un atrašanās vietu, kā arī atzītās inficēšanās/apūdeņošanas lieguma teritorijas lielumu;

g) tomātu augu sūtījumam vai partijai, kas atzīta par inficētu, jāpievieno Direktīvas 2000/29/EK 13. panta 1. punkta ii) daļā minētie sertifikāti un pases numurs saskaņā ar Direktīvas 2000/29/EK V pielikuma A daļas I iedaļas 2.2. punktā minēto uzskaitījumu;

h) pārējā informācija par apstiprināto slimības uzliesmojumu, kādu pieprasa Komisija.

VI PIELIKUMS

1. Direktīvas 6. pantā 1. punktā minētie noteikumi ir šādi:

— izmantošana lopbarībā pēc termiskās apstrādes, novēršot risku, ka organisms varētu izdzīvot,

vai

— atkritumu iznīcināšana oficiāli apstiprinātā īpašā atkritumu iznīcināšanas vietā, kur nav nosakāma riska, ka šis organisms varētu iekļūt vidē, piemēram, iesūcoties lauksaimniecības zemē vai saskaroties ar ūdens avotiem, kurus varētu izmantot lauksaimniecības zemes apūdeņošanai,

vai

— sadedzināšana,

vai

— rūpnieciskās pārstrādes izmantošana, tieši un tūlīt tos piegādājot pārstrādes rūpnīcā ar atbilstošām atkritumu apglabāšanas iekārtām, attiecībā uz ko ir noteikts, ka nav nosakāma šā organisma izplatīšanās riska, un vismaz ar izbraucošo transporta līdzekļu tīrīšanas un dezinfekcijas sistēmu,

vai

— citi pasākumi, ja ir konstatēts, ka tie nerada nosakāmu organisma izplatīšanās risku; par šiem pasākumiem un to pamatojumus jāpaziņo Komisijai un pārējām dalībvalstīm.

Visus atlikušos atkritumus, kas ir saistīti ar un izriet no iepriekš minētajām iespējām, iznīcina ar oficiāli apstiprinātām paņēmieniem saskaņā ar šīs direktīvas VII pielikumu.

2. Uzskaitītajam stādāmajam materiālam ir turpmāk norādītās piemērotas izmantošanas vai iznīcināšanas iespējas, kas minētas 6. panta 2. punktā un kas ir jāīsteno attiecīgās(-o) dalībvalsts(-u) atbildīgo valsts struktūru kontrolē, atbildīgajām valsts struktūrām savā starpā sazinoties, lai visos gadījumos nodrošinātu organisma apkarošanu un iegūtu tās dalībvalsts valsts struktūras apstiprinājumu, kurā kartupeļus paredzēts iesaiņot vai pārstrādāt, atsaucoties uz pirmajā un otrajā ievilkumā minētajām atkritumu iznīcināšanas iekārtām:

i) kartupeļu bumbuļiem:

— izmantošana pārtikas kartupeļu veidā, kas iesaiņoti tiešai piegādei un izmantošanai bez atkārtotas iesaiņošanas vietās, kurās ir pienācīgas atkritumu iznīcināšanas iekārtas. Stādīšanai paredzētos kartupeļus drīkst apstrādāt tikai tajā pašā vietā, ja to veic atsevišķi vai pēc tīrīšanas un dezinfekcijas,

vai

— izmantošana rūpnieciskai pārstrādei pārtikas kartupeļu veidā, kas ir paredzēti tiešai un tūlītējai piegādei pārstrādes rūpnīcā ar atbilstošām atkritumu apglabāšanas un dezinfekcijas iekārtām, un vismaz ar izbraucošo transporta līdzekļu tīrīšanas un dezinfekcijas sistēmu,

vai

— izmantošana vai iznīcināšana citā veidā, ja tiek konstatēts, ka tas nerada nosakāmu organisma izplatīšanās risku, un ja to apstiprinājušas minētās atbildīgās valsts iestādes;

ii) citām augu daļām, tostarp stublājiem un lapu atliekām:

— iznīcināšana

vai

— citi izmantošanas vai iznīcināšanas veidi, ja ir konstatēts, ka tie nerada nosakāmu organisma izplatīšanās risku; un tie jāapstiprina minētajām atbildīgajām valsts iestādēm.

3. Piemērotas objektu dekontaminācijas metodes, kas minētas 6. panta 3. punktā, ir tīrīšana un vajadzības gadījumā dezinfekcija, lai novērstu nosakāmu organisma izplatīšanās risku, tās piemēro dalībvalstu atbildīgo valsts struktūru uzraudzībā.

4. Norobežotajā(-ās) teritorijā(-ās), kuras(-as) paredzēta(-as) 5. panta 1. punkta a) apakšpunkta iv) daļā un c) apakšpunkta iii) daļā un minētas 6. panta 4. punktā, dalībvalstīm jāīsteno virkne pasākumu, tostarp turpmāk minētie.

4.1. Ja audzēšanas vietas ir atzītas par inficētām saskaņā ar 5. panta 1. punkta a) apakšpunkta ii) daļu:

a) laukā vai segtās platības vienībā, kas atzīta par inficētu saskaņā ar 5. panta 1. punkta a) apakšpunkta ii) daļu, šādos gadījumos:

i) vismaz četrus veģetācijas gadus pēc tā(-ās) atzīšanas par inficētu:

— veic pasākumus, lai iznīcinātu pārziemojušo kartupeļu un pašizsējas tomātu augu, kā arī citu organisma saimniekaugus, un tostarp nakteņu dzimtas nezāles,

un

— neaudzē šādus augus:

— kartupeļu bumbuļus vai augus, vai īstās sēklas,

— tomātu augus un sēklas,

— ņemot vērā organisma bioloģiju:

— citus saimniekaugus,

— *Brassica* sugas augus, saistībā ar kuriem pastāv nosakāms organisma izdzīvošanas risks,

— kultūras, saistībā ar kurām pastāv nosakāms organisma izplatīšanās risks,

— pirmajā kartupeļu vai tomātu ražas sezonā, kas seko iepriekšējā ievilkumā noteiktajam periodam, ja laukā nav pārziemojušo kartupeļu un pašizsējas tomātu augu, kā arī citu saimniekaugu, tostarp nakteņu dzimtas nezāļu, vismaz divus secīgus veģetācijas gadus pirms stādīšanas,

— attiecībā uz kartupeļiem atļauta tikai pārtikas kartupeļu audzēšana,

— novāktie kartupeļu bumbuļi vai tomātu augi attiecīgajā gadījumā tiek testēti saskaņā ar procedūru, kas sīki izklāstīta II pielikumā,

— kartupeļu vai tomātu ražas sezonās, kas seko aiz iepriekšējā ievilkumā precizētās sezonas un pēc atbilstošā augu maiņas cikla, kas sēklas kartupeļu gadījumā ilgst vismaz divus gadus, jāveic oficiāls apsekojums, kā sīki noteikts 2. panta 1. punktā;

vai

ii) piecu augšanas gadu laikā pēc atzītās inficēšanās gada:

— veic pasākumus, lai iznīcinātu nejauši pārziemojušos kartupeļus un pašizsējas tomātu augus, kā arī citus organisma saimniekaugus, tostarp nakteņu dzimtas nezāles,

un

— pirmos trīs gadus laukā izveido un uztur melno papuvi vai labības sējumus atkarībā no noteiktā riska vai arī pastāvīgas ganības, tās zemu pļaujot, vai intensīvi noganot, vai sēj graudzāles sēklaudzēšanai, pēc tam turpmākos divus gadus tur audzē augus, kuri nav organisma saimniekaugi un par kuriem nepastāv risks, ka organisms tajos varētu izdzīvot vai no tiem izplatīties,

— pirmajā kartupeļu vai tomātu ražas sezonā, kas seko iepriekšējā ievilkumā noteiktajam periodam, ja laukā nav pārziemojušo kartupeļu un pašizsējas tomātu augu, kā arī citu saimniekaugu, tostarp nakteņu dzimtas nezāļu, vismaz divus secīgus veģetācijas gadus pirms stādīšanas:

— attiecībā uz kartupeļiem atļauj tikai sēklas un pārtikas kartupeļu audzēšanu,

— novāktos kartupeļu bumbuļus vai tomātu augus attiecīgajā gadījumā testē saskaņā ar procedūru, kas sīki izklāstīta II pielikumā;

b) visos pārējos laukos par inficētu atzītajā audzēšanas vietā un ar nosacījumu, ka atbildīgās valsts iestādes ir apmierinātas ar to, ka ir novērsts pārziemojušo kartupeļu un pašizsējas tomātu augu, kā arī citu organisma saimniekaugu, tostarp nakteņu dzimtas nezāļu, izplatīšanās risks, ir šādi nosacījumi:

— augšanas gadā, kas seko aiz apzīmētās inficēšanās gada:

— nedrīkst stādīt kartupeļu bumbuļus, augus vai īstās sēklas, vai citus šā organisma saimniekaugus,

vai

— attiecībā uz kartupeļu bumbuļiem drīkst stādīt tikai sertificētus sēklas kartupeļus izmantošanai tikai pārtikas kartupeļu veidā,

— attiecībā uz tomātu augiem drīkst stādīt tikai no sēklām izaudzētus tomātu augus atbilstīgi Direktīvas 2000/29/EK prasībām izmantošanai tikai augļu ievākšanas mērķiem,

— otrajā augšanas gadā, kas seko aiz apzīmētās inficēšanās gada:

— attiecībā uz kartupeļiem atļauts stādīt tikai sertificētus sēklas kartupeļus, kas oficiāli pārbaudīti attiecībā uz tumšās gredzenpuves klātbūtni un audzēti oficiālā uzraudzībā ražošanas vietās, kas nav minētas 4.1. punktā, izmantošanai sēklas vai pārtikas kartupeļu veidā,

— attiecībā uz tomātiem atļauts audzēt tikai no sēklām izaudzētus tomātu augus atbilstīgi Direktīvas 2000/29/EK prasībām vai veģetatīvi pavairotus tomātu augus, kas audzēti no šādām sēklām oficiālā uzraudzībā ražošanas vietās, kas nav minētas 4.1. punktā, augu ražošanas vai augļu ievākšanas mērķiem,

— vismaz trešajā augšanas gadā, kas seko aiz apzīmētās inficēšanās gada:

— attiecībā uz kartupeļiem drīkst stādīt tikai sertificētus sēklas kartupeļus vai oficiālā uzraudzībā audzētus sēklas kartupeļus, kas iegūti no sertificētiem sēklas kartupeļiem, sēklas kartupeļu vai pārtikas kartupeļu ražošanai,

— attiecībā uz tomātiem atļauts drīkst stādīt tikai no sēklām izaudzētus tomātu augus atbilstīgi Direktīvas 2000/29/EK prasībām vai oficiālā uzraudzībā audzētus tomātu augus augu ražošanas vai augļu ievākšanas mērķiem,

— katrā augšanas gadā, kas minēts iepriekšējos ievilkumos, jāīsteno pasākumi, lai likvidētu pārziemojušos kartupeļu augus un citus šā organisma dabiskā izplatībā atrodamus saimniekaugus, ja tādi ir, un piemērotos laikos jāveic stādījumu oficiāla pārbaude, un visos kartupeļu tīrumos jāveic oficiāla novākto kartupeļu pārbaude saskaņā ar II pielikumā sīki izklāstīto procedūru;

c) tūlīt pēc inficēšanās apstiprināšanas saskaņā ar 5. panta 1. punkta a) apakšpunkta ii) daļu un pēc pirmā secīgā augšanas gada veic šādus pasākumus:

— visus mehānismus un glabātavas, kas atrodas audzēšanas vietā un ir saistīti ar kartupeļu vai tomātu audzēšanu, notīra un, vajadzības gadījumā, dezinficē, izmantojot piemērotas 3. punktā minētās metodes,

— ievieš oficiālu apūdeņošanas un laistīšanas programmu uzraudzību pēc vajadzības, ieskaitot to aizliegumu, lai novērstu organisma izplatīšanos;

d) segtās platības vienībā, kas atzīta par inficētu saskaņā ar 5. panta 1. punkta a) apakšpunkta ii) daļu, kad iespējams pilnīgi nomainīt audzēšanas substrātu, veic šādus pasākumus:

— nestāda kartupeļu bumbuļus, augus vai īstās sēklas, vai citus organisma saimniekaugus, tostarp tomātu augus un sēklas, izņemot, ja minētajai vienībai ir veikti oficiāli uzraudzīti pasākumi, lai likvidētu organismu un izvāktu visu saimniekaugu materiālu, tostarp pilnībā nomainot audzēšanas substrātu un veicot šīs vienības tīrīšanu, kā arī vajadzības gadījumā dezinficējot to un visas iekārtas, ja pēc šādu pasākumu veikšanas atbildīgās valsts struktūras ir atļāvušas audzēt kartupeļus vai tomātus,

un

— kartupeļu audzēšanai izmanto sertificētus sēklas kartupeļus, sīkbumbuļus vai meristēmu kultūras, kas iegūti no testētiem avotiem,

— tomātu audzēšanai izmanto no sēklām izaudzētus tomātu augus atbilstīgi Direktīvas 2000/29/EK prasībām vai veģetatīvi pavairotus tomātu augus, kas audzēti no šādām sēklām oficiālā uzraudzībā ražošanas vietās,

— ievieš oficiālu apūdeņošanas un laistīšanas programmu uzraudzību pēc vajadzības, ieskaitot to aizliegumu, lai novērstu organisma izplatīšanos.

4.2. Dalībvalstis norobežotajā teritorijā, neskarot 4.1. punktā paredzētos pasākumus:

a) tūlīt pēc apstiprinātas inficēšanās nodrošina, ka visas iekārtas un glabātavas šajās telpās un telpās, kuras saistītas ar kartupeļu un tomātu ražošanu, vajadzības gadījumā tiek iztīrītas un dezinficētas, izmantojot atbilstošas metodes, kas izklāstītas 3. punktā;

b) nekavējoties un vismaz trīs audzēšanas gadus pēc tās atzīšanas par inficētu:

ba) gadījumos, kad norobežoto teritoriju nosaka saskaņā ar 5. panta 1. punkta a) apakšpunkta iv) daļu, veic šādus pasākumus:

— izmantojot savas atbildīgās valsts struktūras, nodrošina kartupeļu bumbuļu vai tomātu audzēšanas, glabāšanas vai apstrādes telpu uzraudzību, kā arī tādu uzņēmumu uzraudzību, kas, izmantojot savu tehniku, sniedz darbuzņēmēja pakalpojumus kartupeļu vai tomātu audzētājiem,

— pieprasa stādīt tikai sertificētu sēklas materiālu vai sēklu, kas iegūta oficiālā visu attiecīgās teritorijas kartupeļu stādījumu uzraudzībā, un veikt testēšanu pēc tādu sēklas kartupeļu stādījumu novākšanas, kas izaudzēti audzēšanas vietās, kuras atzītas par potenciāli inficētām saskaņā ar 5. panta 1. punkta a) apakšpunkta iii) daļu,

— visās norobežotās teritorijas telpās pieprasa veikt novākto sēklas un galda kartupeļu atsevišķu apstrādi, vai īstenot tīrīšanas un, vajadzības gadījumā, dezinfekcijas procedūru pēc sēklas kartupeļu un pirms pārtikas kartupeļu apstrādes,

— pieprasa, lai šajā teritorijā stādītu tikai tādus tomātu augus, kas izaudzēti no sēklām atbilstīgi Direktīvas 2000/29/EK prasībām, vai veģetatīvi pavairotus tomātu augus, kas audzēti no šādām sēklām oficiālā uzraudzībā ražošanas vietās,

— veic oficiālu apsekojumu, kas aprakstīts 2. panta 1. punktā;

bb) gadījumos, kad virszemes ūdeņi ir atzīti par inficētiem saskaņā ar 5. panta 1. punkta c) apakšpunkta ii) daļu vai ir atzīts, ka tie var izplatīt organismu saskaņā ar V pielikuma 2. punktu, veic šādus pasākumus:

— atbilstošos laikos veic ikgadēju pārbaudi, tostarp ņem paraugus no virszemes ūdeņiem un, vajadzības gadījumā, no nakteņu dzimtas saimniekaugiem, kas aug atbilstošajās ūdenskrātuvēs, un testē tos saskaņā ar atbilstošajām metodēm, kas izklāstītas II pielikumā attiecībā uz uzskaitīto augu materiālu un citiem gadījumiem,

— ievieš oficiālu apūdeņošanas un laistīšanas programmu uzraudzību, tostarp aizliegumu izmantot ūdeni, kas atzīts par inficētu, uzskaitītā stādāmā materiāla un vajadzības gadījumā citu saimniekaugu apūdeņošanai un laistīšanai, lai novērstu organisma izplatīšanos. Šo aizliegumu var pārskatīt, pamatojoties uz rezultātiem, kas iegūti minētajā ikgadējā pārbaudē, un atceltajiem inficēšanās atzinumiem, ja atbildīgās valsts iestādes pārliecinās, ka virszemes ūdeņi vairs nav inficēti. Oficiālas kontroles uzraudzībā saimniekaugu apūdeņošanai un laistīšanai var atļaut tāda ūdens izmantošanu, uz kuru attiecas aizliegums, ja tiek izmantotas oficiāli apstiprinātas metodes, ar kurām organismu iznīcina un nepieļauj tā izplatīšanos,

— gadījumos, ja ir inficēti notekūdeņi, ievieš oficiālu uzraudzību to cieto vai šķidro atkritumu apglabāšanai, kas iegūti no rūpnieciskās pārstrādes vai iepakošanas telpām, kurās notiek darbs ar uzskaitīto stādāmo materiālu;

c) izveido programmu, lai piemērotā periodā vajadzības gadījumā nomainītu visus sēklas kartupeļu krājumus.

VII PIELIKUMS

Lai novērstu jebkuru identificējamu organisma izplatīšanās risku, VI pielikuma 1. punktā minētās oficiāli apstiprinātās atkritumu iznīcināšanas metodes atbilst šādiem nosacījumiem:

i) kartupeļu un tomātu atkritumus (tostarp izbrāķētos kartupeļus, to mizas un tomātus) un visus cietos atkritumus, kas saistīti ar kartupeļiem un tomātiem (tostarp augsni, akmeņus un citus nosēdumus), apsaimnieko:

— atkritumus iznīcinot oficiāli apstiprinātā īpašā atkritumu iznīcināšanas vietā, kur nav nosakāms risks, ka šis organisms varētu iekļūt vidē, piemēram, iesūcoties lauksaimniecības zemē. Atkritumus nogādā tieši uz atkritumu iznīcināšanas vietu, ievērojot aizsargpasākumus, lai atkritumi neizbirtu, vai sadedzinot,

vai

— veicot citus pasākumus,

ja

— ir konstatēts, ka tie nerada nosakāmu organisma izplatīšanās risku; par šiem pasākumiem paziņo Komisijai un pārējām dalībvalstīm;

ii) šķidrie atkritumi: pirms to novadīšanas notekūdeņos, kuru sastāvā ir suspendētas cietās daļiņas, tās atdala ar filtrēšanu vai nostādināšanu. Cietās daļiņas iznīcina atbilstoši i) punkta noteikumiem

Pēc cieto daļiņu atdalīšanas notekūdeņus:

— pirms to novadīšanas vismaz 30 min karsē 60 °C temperatūrā,

— iznīcina citādi, saņemot oficiālu apstiprinājumu un oficiālā uzraudzībā, lai novērstu risku, ka notekūdeņi var nonākt saskarē ar lauksaimniecības zemi vai ūdens avotiem, ko var izmantot lauksaimniecības zemes apūdeņošanai. Par šiem pasākumiem paziņo pārējām dalībvalstīm un Komisijai.

Šajā pielikumā aprakstītās iespējas attiecas arī uz atkritumiem, kas radušies inficēto partiju apstrādē, iznīcināšanā un pārstrādē."