32006L0063

DIREKTIVA KOMISIJE 2006/63/EZ

od 14. srpnja 2006.

o izmjeni priloga II. do VII. Direktivi Vijeća 98/57/EZ o suzbijanju bakterije *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*

KOMISIJA EUROPSKIH ZAJEDNICA,

uzimajući u obzir Ugovor o osnivanju Europske zajednice,

uzimajući u obzir Direktivu Vijeća 98/57/EZ od 20. srpnja 1998. [1] o suzbijanju bakterije *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, a posebno njezin članak 11.,

budući da:

(1) Jedan od značajnih štetnih organizama koji napadaju krumpir i rajčicu je *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, patogeni uzročnik smeđe truleži gomolja krumpira te bakterijskog venuća krumpira i rajčice (dalje u tekstu: organizam).

(2) Organizam se još uvijek pojavljuje u nekim dijelovima Zajednice.

(3) Direktivom 98/57/EZ utvrđene su podrobne mjere koje države članice poduzimaju protiv organizma kako bi ga otkrile i utvrdile njegovu rasprostranjenost, spriječile njegovu pojavu i širenje te, u slučaju njegove pojave, spriječile njegovo širenje i suzbijale ga s ciljem njegovog iskorjenjivanja.

(4) U međuvremenu je došlo do značajnih novih spoznaja o biologiji organizma i postupcima za njegovo otkrivanje i identifikaciju; pored toga, praktična iskustva do kojih se došlo pri suzbijanju organizma zahtijevaju preispitivanje nekih tehničkih odredbi vezanih uz mjere suzbijanja.

(5) S obzirom na te spoznaje čini se potrebnim preispitati i ažurirati mjere iz nekih priloga Direktivi 98/57/EZ.

(6) Što se tiče postupaka otkrivanja i identifikacije, uključena je suvremena tehnika otkrivanja - fluorescencijska *in situ* hibridizacija (FISH). Uključena su i poboljšanja metode lančane reakcije polimeraze kao i poboljšanja različitih tehničkih elemenata sadašnjih postupaka otkrivanja i identifikacije te metode za otkrivanje i identifikaciju organizma u drugim biljkama domaćinima osim krumpira te u vodi i tlu.

(7) Što se tiče tehničkih elemenata mjera suzbijanja, poboljšane su odredbe za: način čuvanja ispitanih uzoraka kako bi se osigurala sljedivost organizma, elemente potrebne za utvrđivanje opsega vjerojatne kontaminacije, podrobnosti o obavješćivanju o svakoj potvrđenoj prisutnosti organizma i o kontaminiranoj zoni, mjere koje treba provoditi na mjestima proizvodnje koja su proglašena kontaminiranim i koja se nalaze unutar razgraničenih zona. Pored toga, uvrštene su i neke odredbe za rajčicu kako bi se više uzela u obzir važnost ove biljke kao domaćina organizma.

(8) Mjere utvrđene ovom Direktivom u skladu su s mišljenjem Stalnog odbora za biljno zdravstvo,

DONIJELA JE OVU DIREKTIVU:

Članak 1.

Prilozi II. do VII. Direktivi 98/57/EZ zamjenjuju se odgovarajućim tekstovima iz Priloga ovoj Direktivi.

Članak 2.

1. Države članice donose i objavljuju zakone te druge propise potrebne za usklađivanje s ovom Direktivom najkasnije do 31. ožujka 2007. One Komisiji odmah dostavljaju tekst tih odredaba i korelacijsku tablicu između tih odredaba i ove Direktive.

One primjenjuju te odredbe od 1. travnja 2007.

Kada države članice donose ove odredbe, te odredbe prilikom njihove službene objave sadržavaju uputu na ovu Direktivu ili se uz njih navodi takva uputa. Načine tog upućivanja određuju države članice.

[1] SL L 235, 21.8.1998., str. 1.

2. Države članice Komisiji dostavljaju tekst glavnih odredaba nacionalnog prava koje donesu u području na koje se odnosi ova Direktiva.

Članak 3.

Ova Direktiva stupa na snagu trećeg dana od dana objave u *Službenom listu Europske unije*.

Članak 4.

Ova je Direktiva upućena državama članicama.

Sastavljeno u Bruxellesu 14. srpnja 2006.

Za Komisiju

Markos KYPRIANOU

Član Komisije

PRILOG

„PRILOG II.

POSTUPAK ISPITIVANJA U SVRHU DIJAGNOSTICIRANJA, OTKRIVANJA I IDENTIFIKACIJE BAKTERIJE *RALSTONIA SOLANACEARUM* (SMITH) YABUUCHI ET *AL.*

PODRUČJE PRIMJENE POSTUPKA ISPITIVANJA

Ovim se postupkom opisuju različiti koraci koje treba poduzeti pri:

i. dijagnosticiranju smeđe truleži gomolja krumpira i bakterijskog venuća krumpira, rajčice i drugih biljaka domaćina;

ii. otkrivanju bakterije *Ralstonia solanacearum* u uzorcima gomolja krumpira i biljaka krumpira i rajčice kao i drugih biljaka domaćina te u vodi i tlu;

iii. identifikaciji bakterije *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*).

SADRŽAJ

Stranica

Opća načela 210

ODJELJAK I: Primjena postupka ispitivanja 210

1. Postupak otkrivanja u svrhu dijagnosticiranja smeđe truleži i bakterijskog venuća (*Ralstonia solanacearum*) u gomoljima krumpira te biljkama krumpira i rajčice te drugim biljkama domaćinima sa simptomima smeđe truleži ili bakterijskog venuća 210

2. Postupak za otkrivanje i identifikaciju bakterije *Ralstonia solanacearum* u uzorcima asimptomatskih gomolja krumpira 213

3. Postupak za otkrivanje i identifikaciju bakterije *Ralstonia solanacearum* u uzorcima asimptomatskih biljaka krumpira, rajčice ili drugih biljaka domaćina 216

ODJELJAK II. Podrobne metode za otkrivanje bakterije *Ralstonia solanacearum* u gomoljima krumpira i na biljkama krumpira, rajčice ili drugih biljaka domaćina sa simptomima smeđe truleži odnosno bakterijskog venuća 218

1. Simptomi 218

2. Brzi testovi probira 218

3. Postupak izdvajanja 219

4. Identifikacijski testovi za *R. solanacearum* 219

ODJELJAK III. 1. Podrobne metode za otkrivanje i identifikaciju bakterije *Ralstonia solanacearum* u uzorcima asimptomatskih gomolja krumpira 219

1.1. Pripremanje uzorka 219

1.2. Testiranje 221

2. Podrobne metode za otkrivanje i identifikaciju bakterije *R. solanacearum* u uzorcima asimptomatskih biljaka krumpira, rajčice ili drugih biljaka domaćina 221

2.1. Pripremanje uzorka 221

2.2. Testiranje 222

ODJELJAK IV. 1. Postupak za otkrivanje i identifikaciju bakterije *R. solanacearum* u vodi 223

2. Metode za otkrivanje i identifikaciju bakterije *R. solanacearum* u vodi 225

2.1. Pripremanje uzorka 225

2.2. Testiranje 225

ODJELJAK V. 1. Postupak za otkrivanje i identifikaciju bakterije *R. solanacearum* u tlu 226

2. Metode za otkrivanje i identifikaciju bakterije *R. solanacearum* u tlu 228

2.1. Pripremanje uzorka 228

2.2. Testiranje 228

Stranica

ODJELJAK VI. Optimizirani protokoli za otkrivanje i identifikaciju bakterije *R. solanacearum* 228
A. Dijagnostički testovi i testovi za otkrivanje 228
1. Test eksudacije na stabljici 228
2. Otkrivanje zrnaca poli-β-hidroksibutirata 228
3. Serološki test aglutinacije 229
4. Selektivno izdvajanje 230
4.1. Nasađivanje na selektivnu podlogu 230
4.2. Postupak obogaćivanja 230
5. Test imunofluorescencije (test IF) 231
6. Lančana reakcija polimerazom (test PCR) 234
6.1. Metode pročišćavanja DNK 235
(a) Metoda prema Pastriku (2000) 235
(b) Druge metode 235
6.2. PCR 236
6.3. Analiza produkta PCR-a 236
7. Fluorescencijska in situ hibridizacija (test FISH) 237
8. Imunoenzimni test (ELISA) 239
(a) Neizravna ELISA 239
(b) DASI (neizravni dvojni sendvič) ELISA 240
9. Biološki test 241
B Identifikacijski testovi 242
1. Identifikacijski testovi pomoću hranjive podloge i enzimski testovi 242
2. Test IF 242
3. Test ELISA 243
4. Test PCR 243
5. Test FISH 243
6. Profiliranje masnih kiselina (FAP) 243
7. Metode karakterizacije soja 243
7.1. Određivanje biovara 243
7.2. Genomski otisak 244
7.3. Metode PCR 244
C Potvrdni test 244
Dodatak 1. Laboratoriji uključeni u optimizaciju i validaciju protokola 246
Dodatak 2. Podloge za izdvajanje i uzgoj bakterije *R. solanacearum* 247
Dodatak 3. (A) Standardizirani kontrolni materijali dostupni na tržištu 249
(B) Pripremanje kontrola 250
Dodatak 4. Puferi za postupke ispitivanja 252
Dodatak 5. Određivanje stupnja kontaminacije u testovima IF i FISH 255
Dodatak 6. Validirani protokoli i reagensi za PCR 256
Dodatak 7. Validirani reagensi za test FISH 261
Dodatak 8. Uvjeti uzgoja patlidžana i rajčice 263
Popis literature 264

OPĆA NAČELA

Optimizirani protokoli za pojedine metode, validirani reagensi i pojedinosti za pripremu ispitnih i kontrolnih materijala navedeni su u dodacima. Popis laboratorija koji su sudjelovali u optimizaciji i validaciji protokola nalaze se u Dodatku 1.

S obzirom da protokoli obuhvaćaju otkrivanje karantenskog organizma i uključivat će uporabu živih kultura *R. solanacearum* kao kontrolnih materijala, bit će potrebno obavljati postupke u primjerenim karantenskim uvjetima s odgovarajućom opremom za uklanjanje otpada te pod uvjetima odgovarajućih dozvola koje izdaju službena tijela za karantenu bilja.

Parametri ispitivanja moraju osiguravati dosljedno i ponovljivo otkrivanje razina bakterije *R. solanacearum* na pragovima utvrđenim za izabrane metode.

Obvezna je precizna priprema pozitivnih kontrola.

Ispitivanje prema zahtijevanim pragovima podrazumijeva korištenje ispravnih parametara, održavanje i baždarenje opreme, pažljivo rukovanje reagensima i njihovo čuvanje te poduzimanje svih mjera kojima se sprečava kontaminacija među uzorcima, npr. odvajanje pozitivnih kontrola od ispitivanih uzoraka. Treba primjenjivati norme kontrole kvalitete kako bi se izbjegle administrativne i druge pogreške, posebno pri označivanju i dokumentiranju.

Sumnja na prisutnost, u smislu članka 4. stavka 2. Direktive 98/57/EZ, podrazumijeva da se dobio pozitivan rezultat pri dijagnostičkim testovima i testovima probira obavljenim na uzorku kako je prikazano na sljedećim dijagramima. Pozitivan rezultat dobiven u prvom testu probira (IF test, PCR/FISH, selektivno izdvajanje) mora se potvrditi drugim testom probira koji se temelji na drugačijem biološkom načelu.

Ako se prvim testom probira dobije pozitivan rezultat, sumnja se na kontaminaciju bakterijom *R. solanacearum* te se mora obaviti drugi test probira. Ako se i drugim testom probira dobije pozitivan rezultat, sumnja je potvrđena (sumnja na prisutnost) i ispitivanje se mora nastaviti u skladu s postupkom ispitivanja. Ako se drugim testom probira dobije negativan rezultat, smatra se da uzorak nije kontaminiran bakterijom *R. solanacearum*.

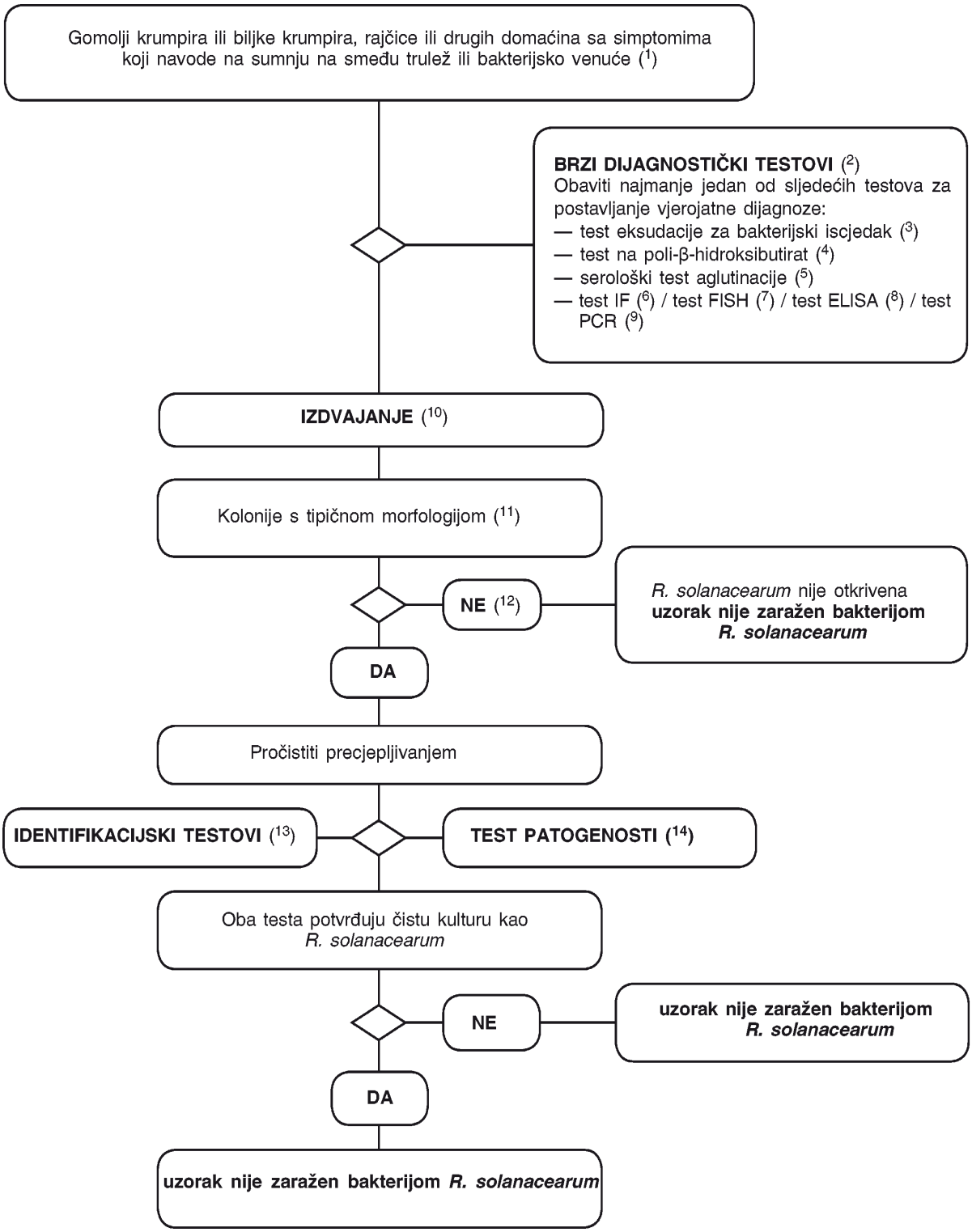
Potvrđena prisutnost u smislu članka 5. stavka 1. Direktive 98/57/EZ podrazumijeva izoliranje i identificiranje čiste kulture *R. solanacearum* i potvrđivanje patogenosti.

ODJELJAK I.

PRIMJENA POSTUPKA ISPITIVANJA

1. **Postupak otkrivanja u svrhu dijagnosticiranja smeđe truleži i bakterijskog venuća (*Ralstonia solanacearum*) u gomoljima krumpira te biljkama krumpira i rajčice te drugim biljkama domaćinima sa simptomima smeđe truleži ili bakterijskog venuća.**

   Postupak ispitivanja se primjenjuje na gomolje krumpira i biljke sa simptomima koji su tipični za smeđu trulež ili bakterijsko venuće ili koji navode na sumnju na njihovu prisutnost. Ovaj postupak uključuje brzi test probira, izdvajanje patogena iz zaraženog vaskularnog tkiva na (selektivnu) podlogu i, u slučaju pozitivnog rezultata, identifikaciju kulture kao bakterije *Ralstonia solanacearum*.


Gomolji krumpira ili biljke krumpira, rajčice ili drugih domaćina sa simptomima koji navode na sumnju na smeđu trulež ili bakterijsko venuće (1)
BRZI DIJAGNOSTIČKI TESTOVI (2)
Obaviti najmanje jedan od sljedećih testova za postavljanje vjerojatne dijagnoze:
— test eksudacije za bakterijski iscjedak (3)
— test na poli-β-hidroksibutirat (4)
— serološki test aglutinacije (5)
— test IF (6) / test FISH (7) / test ELISA (8) / test PCR (9)
IZDVAJANJE (10)
Kolonije s tipičnom morfologijom (11)
NE (12)
R. solanacearum nije otkrivena
uzorak nije zaražen bakterijom R. solanacearum
DA
Pročistiti precjepljivanjem
IDENTIFIKACIJSKI TESTOVI (13)
TEST PATOGENOSTI (14)
Oba testa potvrđuju čistu kulturu kao R. solanacearum
NE
uzorak nije zaražen bakterijom R. solanacearum
DA
uzorak nije zaražen bakterijom R. solanacearum

([1]) Opis simptoma naveden je u odjeljku II.1

([2]) Brzi dijagnostički testovi omogućuju postavljanje vjerojatne dijagnoze, ali nisu presudni. Negativan rezultat ne jamči uvijek odsutnost patogena.

([3]) Test eksudacije za bakterijski iscjedak iz provodnog tkiva stabljike opisan je u odjeljku VI.A.1.

([4]) Test za otkrivanje zrnaca poli-β-hidroksibutirata u bakterijskim stanicama opisan je u odjeljku VI.A.2.

([5]) Serološki testovi aglutinacije na bakterijskom iscjetku ili pripravcima iz simptomatskog tkiva opisani su u odjeljku VI.A.3.

([6]) Test IF na bakterijskom iscjetku suspendiranom u vodi ili na pripravcima iz simptomatskog tkiva opisan je u odjeljku VI.A.5.

([7]) Test FISH na bakterijskom iscjetku suspendiranom u vodi ili na pripravcima iz simptomatskog tkiva opisan je u odjeljku VI.A.7.

([8]) Test ELISA na bakterijskom iscjetku suspendiranom u vodi ili na pripravcima iz simptomatskog tkiva opisan je u odjeljku VI.A.8.

([9]) Test PCR na bakterijskom iscjetku suspendiranom u vodi ili na pripravcima iz simptomatskog tkiva opisan je u odjeljku VI.A.6.

([10]) Patogen se obično može lako izdvojiti iz simptomatskog biljnog materijala metodom razrjeđivanja i nasađivanja na hranjivu podlogu (odjeljak II.3.)

([11]) Tipična morfologija kolonije opisana je u odjeljku II.3.d.

([12]) Uzgoj kulture može biti neuspješan u uznapredovaloj fazi infekcije zbog kompeticije ili pretjeranog razmnožavanja saprofitnih bakterija. Ako su simptomi bolesti tipični, a test izdvajanja negativan, test izdvajanja se mora ponoviti, po mogućnosti na selektivnoj hranjivoj podlozi.

([13]) Pouzdana identifikacija čistih kultura pretpostavljenih izolata bakterije *R. solanacearum* postiže se primjenom testova opisanih u odjeljku VI.B. Subspecifična karakterizacija je opcionalna ali preporučena za svaki novi slučaj.

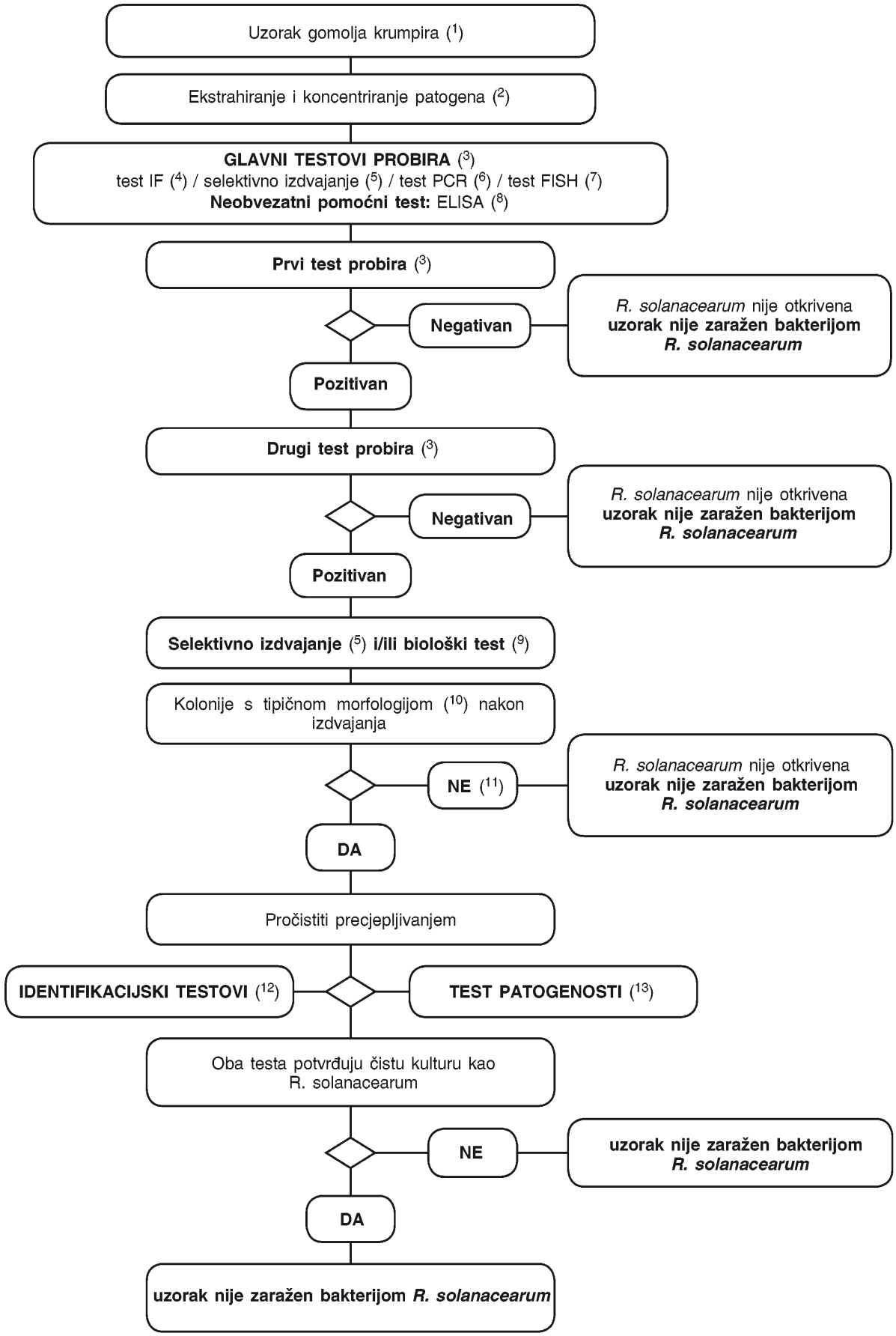
([14]) Test patogenosti opisan je u odjeljku VI.C.

2. **Postupak za otkrivanje i identifikaciju bakterije *Ralstonia solanacearum* u uzorcima asimptomatskih gomolja krumpira**

Načelo:

Svrha ispitivanja je otkriti latentne infekcije u gomoljima krumpira. Pozitivni rezultat najmanje dva testa probira ([3]), koji se temelje na različitim biološkim načelima, mora se dopuniti izdvajanjem patogena nakon čega slijedi, u slučaju izdvajanja tipičnih kolonija, potvrda čiste kulture kao *R. solanacearum*. Pozitivni rezultat dobiven samo jednim testom probira nije dostatan da se uzorak smatra zaraženim.

Testovi probira i testovi izdvajanja moraju omogućiti otkrivanje 10^3 do 10^4 stanica/ml resuspendiranog taloga uključenog kao pozitivna kontrola u svakoj seriji testova.


Uzorak gomolja krumpira (1)
Ekstrahiranje i koncentriranje patogena (2)
GLAVNI TESTOVI PROBIRA (3)
test IF (4) / selektivno izdvajanje (5) / test PCR (6) / test FISH (7)
Neobvezatni pomoćni test: ELISA (8)
Prvi test probira (3)
Negativan
R. solanacearum nije otkrivena
uzorak nije zaražen bakterijom
R. solanacearum
Pozitivan
Drugi test probira (3)
Negativan
R. solanacearum nije otkrivena
uzorak nije zaražen bakterijom
R. solanacearum
Pozitivan
Selektivno izdvajanje (5) i/ili biološki test (9)
Kolonije s tipičnom morfologijom (10) nakon izdvajanja
NE (11)
R. solanacearum nije otkrivena
uzorak nije zaražen bakterijom
R. solanacearum
DA
Pročistiti precjepljivanjem
IDENTIFIKACIJSKI TESTOVI (12)
TEST PATOGENOSTI (13)
Oba testa potvrđuju čistu kulturu kao R. solanacearum
NE
uzorak nije zaražen bakterijom
R. solanacearum
DA
uzorak nije zaražen bakterijom R. solanacearum

([1]) Standardna veličina uzoraka je 200 gomolja, iako se postupak može obaviti i na manjim uzorcima ako nije na raspolaganju 200 gomolja.

([2]) Metode ekstrahiranja i koncentriranja patogena opisane su u odjeljku III.1.1.

([3]) Ako najmanje dva testa koja se temelje na različitim biološkim načelima daju pozitivan rezultat, treba obaviti izdvajanje i potvrdu. Obavite najmanje jedan test probira. Ako je taj test negativan, uzorak se smatra negativnim. Ako je test pozitivan, treba obaviti još jedan ili više testova probira koji se temelje na različiti biološkim načelima kako bi se provjerio prethodno dobiveni pozitivni rezultat. Ako drugi test ili ostali testovi daju pozitivan rezultat, uzorak se smatra negativnim. Daljnji testovi nisu potrebni.

([4]) Test IF opisan je u odjeljku VI.A.5.

([5]) Test selektivnog izdvajanja opisan je u odjeljku VI.A.4.

([6]) Testovi PCR opisani su u odjeljku VI.A.6.

([7]) Test FISH opisan je u odjeljku VI.A.7.

([8]) Testovi ELISA opisani su u odjeljku VI.A.8.

([9]) Biološki test opisan je u odjeljku VI.A.9.

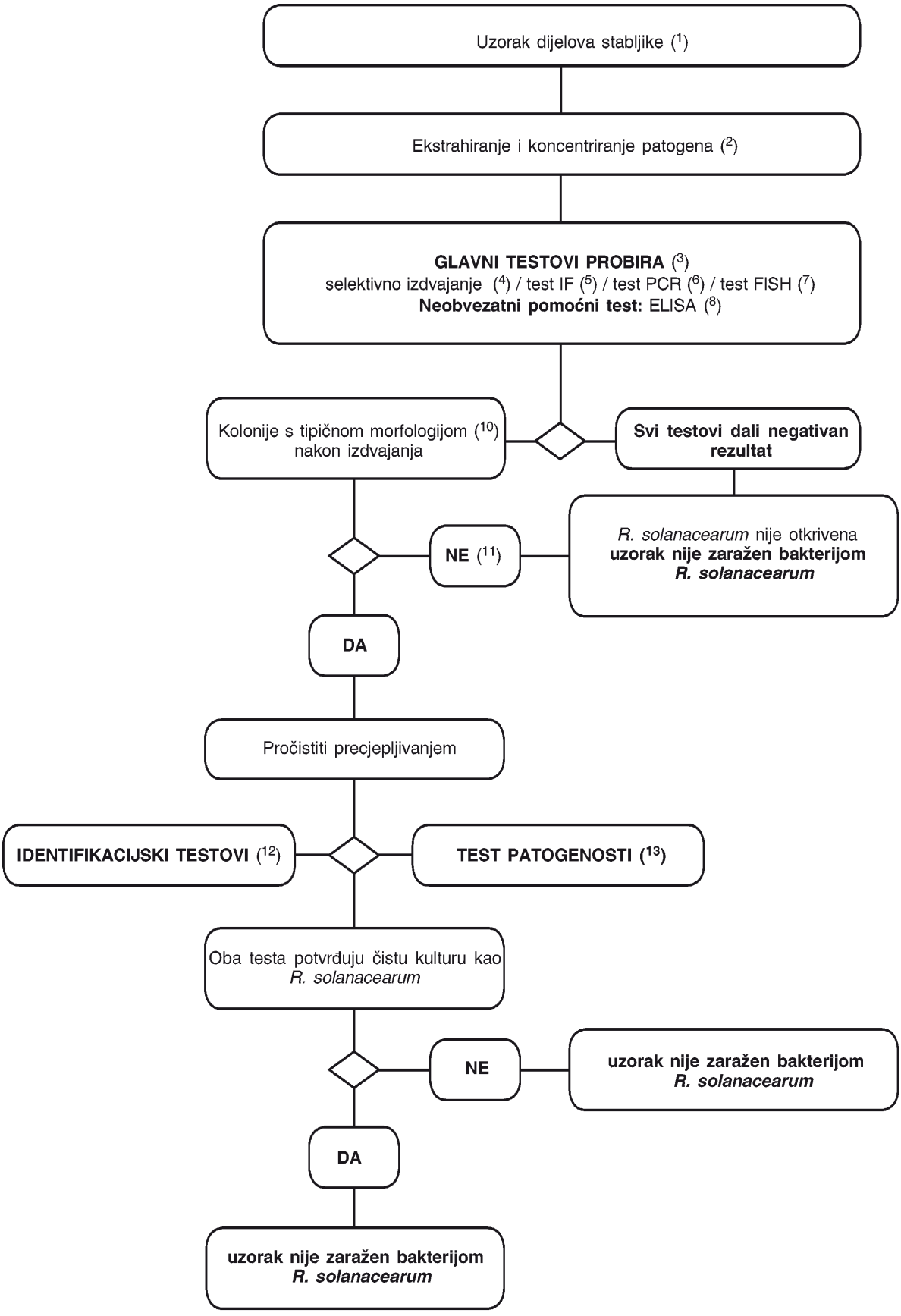
([10]) Tipična morfologija kolonije opisana je u odjeljku II.3.d.

([11]) Uzgoj kulture ili biološki testovi mogu biti neuspješni zbog kompeticije ili inhibicije saprofitnih bakterija. Ako se testovima probira dobiju jasno pozitivni rezultati, a testovi izdvajanja su negativni, ponovite testove izdvajanja iz iste pelete ili uzimanjem dodatnog provodnog tkiva iz baznog dijela blizu stolona razrezanih gomolja iz istog uzorka te, ako je potrebno, ispitajte dodatne uzorke..

([12]) Pouzdana identifikacija čistih kultura pretpostavljenih izolata bakterije *R. solanacearum* postiže se primjenom testova opisanih u odjeljku VI.B.

([13]) Test patogenosti opisan je u odjeljku VI.C.

3. **Postupak za otkrivanje i identifikaciju bakterije *Ralstonia solanacearum* u uzorcima asimptomatskih biljaka krumpira, rajčice ili drugih biljaka domaćina**



([1]) Za preporučene veličine uzoraka vidjeti odjeljak III.2.1.

([2]) Metode ekstrahiranja i koncentriranja patogena opisane su u odjeljku III.2.1.

([3]) Ako najmanje dva testa koja se temelje na različitim biološkim načelima daju pozitivan rezultat, treba obaviti izdvajanje i potvrdu. Obavite najmanje jedan test probira. Ako je taj test negativan, uzorak se smatra negativnim. Ako je test pozitivan, treba obaviti još jedan ili više testova probira koji se temelje na različiti biološkim načelima kako bi se provjerio prethodno dobiveni pozitivni rezultat. Ako drugi test ili ostali testovi daju pozitivan rezultat, uzorak se smatra negativnim. Daljnji testovi nisu potrebni.

([4]) Test selektivnog izdvajanja opisan je u odjeljku VI.A.4.

([5]) Test IF opisan je u odjeljku VI.A.5.

([6]) Testovi PCR opisani su u odjeljku VI.A.6.

([7]) Test FISH opisan je u odjeljku VI.A.7.

([8]) Testovi ELISA opisani su u odjeljku VI.A.8.

([9]) Biološki test opisan je u odjeljku VI.A.9.

([10]) Tipična morfologija kolonije opisana je u odjeljku II.3.d.

([11]) Uzgoj kulture ili biološki testovi mogu biti neuspješni zbog kompeticije ili inhibicije saprofitnih bakterija. Ako se testovima probira dobiju pozitivni rezultati, a testovi izdvajanja su negativni, ponovite testove izdvajanja.

([12]) Pouzdana identifikacija čistih kultura pretpostavljenih izolata bakterije *R. solanacearum* postiže se primjenom testova opisanih u odjeljku VI.B.

([13]) Test patogenosti opisan je u odjeljku VI.C.

ODJELJAK II.

PODROBNE METODE ZA OTKRIVANJE BAKTERIJE *RALSTONIA SOLANACEARUM* U GOMOLJIMA KRUMPIRA I NA BILJKAMA KRUMPIRA, RAJČICE ILI DRUGIH BILJAKA DOMAĆINA SA SIMPTOMIMA SMEĐE TRULEŽI ODNOSNO BAKTERIJSKOG VENUĆA

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

1.1. Simptomi na krumpiru

Biljka krumpira. Početna faza infekcije u polju prepoznaje se po venuću lišća pri vrhu biljke na visokim temperaturama tijekom dana ali koje se oporavlja tijekom noći. U ranim fazama venuća lišće ostaje zeleno ali kasnije počinje žutjeti i razvija se smeđa nekroza. Javlja se i epinastija. Vrlo brzo dolazi do nepovratnog venuća izdanka ili cijele biljke što dovodi do propadanja i odumiranja biljke. Provodno tkivo poprečno prerezanih stabljika uvenule biljke obično je smeđe boje, a iz prerezane površine curi ili se lako može gnječenjem istisnuti mliječni bakterijski iscjedak. Kad se prerezana stabljika stavi uspravno u vodu, vlakna sluzi će izlaziti iz žilnih snopova.

Gomolj krumpira. Gomolje krumpira treba prerezati poprečno u blizini baznog dijela (stolone) ili uzdužno preko stolone. Početna faza infekcije prepoznaje se po staklasto-žutoj do svijetlosmeđoj obojenosti žilnog prstena iz kojeg se, nakon nekoliko minuta, spontano pojavljuje blijedi kremasti bakterijski iscjedak. Kasnije, provodno tkivo postaje izražajnije smeđe i nekroza se može proširiti na parenhimsko tkivo. U uznapredovalim fazama infekcija izbija prema van od kraja stolone i okaca iz kojih može istjecati bakterijska sluz na koju se lijepe čestice zemlje. Zbog unutarnjeg odumiranja provodnog tkiva na pokožici se mogu pojaviti crvenkasto-smeđe, blago upale lezije. U uznapredovalim fazama bolesti uobičajen je i sekundarni razvoj gljivične i bakterijske gnjiloće.

1.2. Simptomi na rajčici

Biljka rajčice. Prvi vidljivi simptom je mlohavost najmlađih listova. U okolišnim uvjetima koji su povoljni za patogen (temperatura tla oko 25 °C; zasićenost vlagom) u roku od nekoliko dana dolazi do epinastije i venuća jedne strane biljke ili cijele biljke što dovodi do potpunog propadanja biljke. U nepovoljnijim uvjetima (temperatura tla manja od 21 °C) venuće je manje ali se na stabljici može razviti veliki broj adventivnog korijenja. Moguće je uočiti vodom natopljene pruge koje se protežu duž stabljike, od njenog podnožja, a dokaz su nekroze u provodnom ustavu. Ako se stabljika poprečno prereže, iz provodnih tkiva čija je boja primijenjena u smeđe curi bijeli ili žućkasti bakterijski iscjedak.

1.3. Simptomi na drugim biljkama domaćinima

Biljke Solanum dulcamara i S. nigrum. U prirodnim uvjetima rijetko se uočavaju simptomi venuća kod ovih biljaka domaćina, osim ako temperatura tla prelazi 25 °C ili ako su razine inokuluma izuzetno visoke (kao npr. za *S. nigrum* koji raste blizu oboljele biljke krumpira ili rajčice). Ako dođe do venuća, simptomi su isti kao i kod rajčice. Kod biljaka *S. dulcamara* koje ne venu i koje rastu sa stabljikama i korijenjem u vodi može doći do svijetlosmeđe obojenosti provodnih tkiva na poprečnom dijelu dna stabljike ili dijelovima stabljike koji su pod vodom. Bakterije mogu izbijati u obliku iscjetka iz prerezanih provodnih tkiva ili tvoriti vlakna sluzi ako prerezanu stabljiku stavimo uspravno u vodu, čak i ako nema simptoma venuća.

2. **Brzi testovi probira**

Brzi testovi probira omogućuju postavljanje vjerojatne dijagnoze, ali nisu presudni. Primijenite jedan ili više sljedećih validiranih testova:

2.1. Test eksudacije na stabljici

(vidjeti odjeljak VI.A.1.)

2.2. Otkrivanje zrnaca poli-β-hidroksibutirata (PHB)

Karakteristična zrnca PHB-a u stanicama *R. solanacearum* postaju vidljiva pri bojanju termički fiksiranog razmaza bakterijskog iscjetka iz zaraženog tkiva na mikroskopskom stakalcu nilskim plavilom A i sudanskim crnilom B. (vidjeti odjeljak VI.A.2.).

2.3. Serološki testovi aglutinacije

(vidjeti odjeljak VI.A.3.)

2.4. Ostali testovi

U ostale prikladne brze testove probira spadaju test IF (vidjeti odjeljak VI.A.5.), test FISH (vidjeti odjeljak VI.A.7.), testovi ELISA (vidjeti odjeljak VI.A.8.) i testovi PCR (vidjeti odjeljak VI.A.6.).

3. **Postupak izdvajanja**

(a) Uzmite iscjedak ili dijelove tkiva promijenjene boje sa žilnog prstena gomolja krumpira ili iz žilnih snopića stabljike krumpira, rajčice ili drugih venućih biljaka domaćina. Suspendirajte u manjoj količini sterilne destilirane vode ili u 50 mM fosfatnog pufera (Dodatak 4.) te ostavite 5 do 10 minuta.

(b) Pripremite niz decimalnih razrjeđenja suspenzije.

(c) Prenesite 50-100 µl suspenzije i razrjeđenja na uobičajenu hranjivu podlogu (NA, YPGA ili SPA; vidjeti Dodatak 2.) i/ili na Kelmanovu tetrazol-podlogu (Dodatak 2.) i/ili na validiranu selektivnu podlogu (npr. SMSA; vidjeti Dodatak 2.). Razmažite ili razvucite u tanke pruge primjenjujući odgovarajuću tehniku nanošenja razrjeđenja na podlogu. Ako se smatra korisnim, pripremite odvojene ploče s razrijeđenom staničnom suspenzijom bakterije *R. solanacearum* biovar 2 za pozitivnu kontrolu.

(d) Inkubirajte ploče dva do šest dana na 28 °C.

— Na uobičajenoj hranjivoj podlozi virulentni izolati bakterije *R. solanacearum* stvaraju plosnate, nepravilne i tekuće kolonije biserne kremasto-bijele boje, često s karakterističnim spiralama u sredini. Nevirulentni oblici bakterije *R. solanacearum* stvaraju male, okrugle, netekuće, maslaste kolonije koje su u cijelosti kremasto-bijele boje.

— Na Kelmanovoj tetrazol-podlozi i na SMSA spirale su krvavo crvene boje. Nevirulentni oblici bakterije *R. solanacearum* stvaraju male, okrugle, netekuće, maslaste kolonije koje su u cijelosti tamno crvene boje.

4. **Identifikacijski testovi za *R. solanacearum***

Testovi za potvrđivanje identifikacije pretpostavljenih izolata *R. solanacearum* navedeni su u odjeljku VI.B.

ODJELJAK III.

1. **Podrobne metode za otkrivanje i identifikaciju bakterije *Ralstonia solanacearum* u uzorcima asimptomatskih gomolja krumpira**

1.1. Pripremanje uzorka

Napomena:

— Standardna veličina uzorka je 200 gomolja po testu. Intenzivnije uzorkovanje znači da se na uzorcima ove veličine obavlja više testova. Veći broj gomolja u uzorku dovest će do inhibicije ili će otežati tumačenje rezultata. Međutim, ako je na raspolaganju manje gomolja, postupak se može primijeniti i na uzorcima s manje od 200 gomolja.

— Validacija svih metoda otkrivanja, koje su opisane u daljnjem tekstu, temelji se na ispitivanju uzoraka s 200 gomolja.

— Ekstrakt krumpira koji je opisan u daljnjem tekstu može se koristiti i za otkrivanje bakterije *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* koja uzrokuje prstenastu trulež gomolja krumpira.

Neobvezna obrada prije pripremanja uzorka:

(a) Inkubirajte uzorak na 25-30 °C u razdoblju do dva tjedna prije izvođenja testova, kako bi se potaklo umnožavanje populacija bakterije *R.-solanacearum.*

(b) Operite gomolje. Upotrijebite odgovarajuća dezinfekcijska sredstva (spojeve klora u slučaju testa PCR, kako bi se uklonila patogena DNK) i deterdžente između svakog uzorka. Osušite gomolje na zraku. Ovaj je postupak pranja naročito koristan (ali ne i obvezatan) za uzorke na kojima je previše čestica tla i ako će se obavljati test PCR ili postupak neposrednog izdvajanja.

1.1.1. Čistim i dezinficiranim skalpelom ili nožem za povrće uklonite pokožicu na krajevima stolone gomolja tako da provodno tkivo bude vidljivo. Pažljivo izrežite malu stožastu jezgru provodnog tkiva na kraju stolone pazeći da količina neprovodnog tkiva bude što je moguće manja. (vidjeti internetsku stranicu http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

Napomena: Odvojite sve (trule) gomolje sa simptomima koji ukazuju na moguću smeđu trulež i testirajte ih posebno.

Ako se pri uklanjanju jezgre stolone uoče simptomi koji ukazuju na moguću smeđu trulež, taj se gomolj mora vizualno pregledati i prerezati blizu stolone. Svaki prerezani gomolj sa sumnjivim simptomima treba držati najmanje dva dana na sobnoj temperaturi kako bi se omogućila suberizacija te čuvati u hladnjaku (na temperaturi od 4 do 10 °C) u odgovarajućim karantenskim uvjetima. Svi se gomolji, uključujući i one sa sumnjivim simptomima, trebaju čuvati u skladu s Prilogom III.

1.1.2. Jezgre stolona sakupite u neupotrebljavane spremnike za jednokratnu uporabu koji se mogu zatvoriti i/ili zapečatiti (ako se radi o spremnicima koji su već upotrebljavani, oni se moraju temeljito očistiti i dezinficirati spojevima klora). Poželjno ih je odmah obraditi. Ako to nije moguće, čuvajte ih u spremniku, bez dodatka pufera, i to najdulje 72 sata u hladnjaku ili najdulje 24 sata na sobnoj temperaturi.

Obradite jezgre stolona jednim od sljedećih postupaka:

ili

(a) dodajte dovoljnu količinu (oko 40 ml) ekstrakcijskog pufera (Dodatak 4.) tako da se pokriju jezgre stolona i tresti na rotacijskoj tresilici (50-100 o/min) 4 sata na temperaturi ispod 24 °C ili 16 do 24 sata u hladnjaku,

ili

(b) homogenizirajte jezgre stolona dovoljnom količinom (oko 40 ml) ekstrakcijskog pufera (Dodatak 4.), bilo u miješalici (npr. Waring ili Ultra Thurax) bilo drobljenjem u dobro zatvorenoj vrećici za maceraciju za jednokratnu uporabu (npr. vrećice Stomacher ili Bioreba od čvrstog politena, 150 mm × 250 mm, sterilizirane zračenjem) koristeći gumeni bat ili prikladnu drobilicu (npr. Homex).

Napomena: Ako se uzorci homogeniziraju u miješalici, postoji velika opasnost od njihove unakrsne kontaminacije. Poduzmite mjere opreza kako biste spriječili nastajanje aerosola ili istjecanje tijekom postupka ekstrakcije. Pobrinite se da za svaki uzorak upotrijebite svježe sterilizirane lopatice i posude miješalice. Ako će se primijeniti test PCR, spriječite prijenos DNK na spremnike ili drobilicu. Za test PCR preporučuje se drobljenje u vrećicama za jednokratnu uporabu i korištenje cijevi za jednokratnu uporabu.

1.1.3. Odlijte supernatant. Ako je previše mutan, razbistrite ga sporim centrifugiranjem (na najviše 180 g 10 minuta na temperaturi od 4 do 10 °C) ili vakuumskom filtracijom (40 do 100 µm), opravši filtar s dodatnim ekstrakcijskim puferom (oko 10 ml).

1.1.4. Koncentrirajte bakterijsku frakciju centrifugiranjem na 7 000 g 15 minuta (ili 10 000 g 10 minuta) na temperaturi od 4 do 10 °C te odlijte supernatant pazeći pri tom da se ne pomiješa talog.

1.1.5. Resuspendirajte talog u 1,5 ml pufera za talog (Dodatak 4.) Upotrijebite 500 µl za testiranje na *R. solanacearum*, 500 µl za *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* i 500 µl kao referentni materijal. U referentni alikvot od 500 µl i u preostale alikvote koji se ispituju dodajte sterilni glicerol do konačne koncentracije od 10 do 25 % (v/v), snažno promiješati (vortex) te pohranite na temperaturi od – 16 do – 24 °C (tjednima) ili od – 68 do – 86 °C (mjesecima). Tijekom testiranja, alikvote koji se ispituju čuvajte na temperaturi od 4 do 10 °C.

Ne preporučuje se višekratno zamrzavanje i odmrzavanje.

Ako se ekstrakt mora prevoziti, treba osigurati da se on dostavi u prijenosnome hladnjaku i da se prijevoz obavi u roku od 24 do 48 sati.

1.1.6. Sve pozitivne kontrole i uzorci *R. solanacearum* moraju se odvojeno obrađivati kako bi se izbjegla kontaminacija. To vrijedi i za stakalca za imunofluorescenciju kao i za sve testove.

1.2. Testiranje

Vidjeti dijagram te opis testova i optimizirane protokole u odgovarajućim dodacima:

Selektivno izdvajanje (vidjeti odjeljak VI.A.4.)

Test IF (vidjeti odjeljak VI.A.5.)

Testovi PCR (vidjeti odjeljak VI.A.6.)

Test FISH (vidjeti odjeljak VI.A.7.)

Testovi ELISA (vidjeti odjeljak VI.A.8.)

Biološki test (vidjeti odjeljak VI.A.9.)

2. **Podrobne metode za otkrivanje i identifikaciju bakterije *R. solanacearum* u uzorcima asimptomatskih biljaka krumpira, rajčice ili drugih biljaka domaćina**

2.1. Pripremanje uzorka

Napomena: Za otkrivanje latentnih populacija bakterije *R. solanacearum* preporučuje se testiranje kompozitnih uzoraka. Postupak se može prikladno primijeniti na kompozitne uzorke s najviše 200 dijelova stabljike. Ako se provode istraživanja, ona se moraju temeljiti na statistički reprezentativnom uzorku biljne populacije koja se ispituje.

2.1.1. Sakupite dijelove stabljike veličine 1 do 2 cm u zatvoreni sterilni spremnik u skladu sa sljedećim postupcima uzorkovanja:

Sadnice rajčice iz rasadnika. Čistim dezinficiranim nožem odrežite dio veličine 1 cm s dna svake stabljike, neposredno iznad razine tla.

Odrasle biljke rajčice iz polja ili staklenika. Čistim, dezinficiranim nožem odrežite najniži izdanak na svakoj biljci režući tik iznad spoja s osnovnom stabljikom. Sa svakog bočnog izdanka odrežite donji dio veličine 1 cm.

Ostale biljke domaćini. Čistim, dezinficiranim nožem ili škarama za rezidbu odrežite dio veličine 1 cm s dna svake stabljike, neposredno iznad razine tla. Ako se radi o *S. dulcamara* ili drugim biljkama domaćinima koje rastu u vodi, odrežite dio veličine 1-2 cm s podzemnog dijela stabljike ili sa stolona s vodenim korijenjem.

Pri uzorkovanju na određenoj lokaciji, preporučuje se testirati statistički reprezentativni uzorak od najmanje 10 biljaka po mjestu uzorkovanja za svaku vrstu samoniklog bilja koja je potencijalni domaćin. Otkrivanje patogena najpouzdanije je krajem proljeća, ljeta i jeseni, iako se prirodne infekcije mogu otkriti tijekom cijele godine kod višegodišnje biljke *Solanum dulcamara* koja raste u tekućicama. Među poznate domaćine spadaju samonikle biljke krumpira (gomolji ostali u tlu), *Solanum dulcamara, S. nigrum, Datura stramonium* i drugi pripadnici porodice Solanaceae. Ostale biljke domaćini su *Pelargonium* spp. i *Portulaca oleracea*. Među europske vrste samoniklog bilja koje u specifičnim okolišnim uvjetima mogu biti potencijalni domaćini populacija *R. solanacearum* biovar 2/rasa 3 u korijenju i/ili rizosferama spadaju *Atriplex hastata, Bidens pilosa, Cerastium glomeratum, Chenopodium album, Eupatorium cannabinum, Galinsoga parviflora, Ranunculus scleratus, Rorippa* spp, *Rumex* spp., *Silene alba, S. nutans., Tussilago farfarra* i *Urtica dioica*.

Napomena: U ovoj se fazi može obaviti vizualni pregled kako bi se utvrdili unutarnji simptomi (obojenost žila ili bakterijski iscjedak). Odvojite na stranu sve dijelove stabljike sa simptomima i testirajte ih posebno. (vidjeti odjeljak II.).

2.1.2. Kratko dezinficirajte dijelove stabljike 70 %-tnim etanolom i odmah ih osušite na upijajućem papiru. Dijelove stabljike potom obradite jednim od sljedećih postupaka:

ili

(a) prekrijte ih dovoljnom količinom (oko 40 ml) ekstrakcijskog pufera (Dodatak 4.) i tresite na rotacijskoj tresilici (50-100 o/min) četiri sata na temperaturi ispod 24 °C ili 16 do 24 sata u hladnjaku,

ili

(b) odmah ih obradite drobljenjem u čvrstoj vrećici za maceraciju (npr. Stomacher ili Bioreba) s odgovarajućom količinom ekstrakcijskog pufera (Dodatak 4.) koristeći gumeni bat ili prikladnu drobilicu (npr. Homex). Ako to nije moguće, dijelove stabljike čuvajte u hladnjaku najdulje 72 sata ili na sobnoj temperaturi najdulje 24 sata.

2.1.3. Nakon 15 minuta taloženja, izlijte supernatant.

2.1.4. Dodatno bistrenje ekstrakta ili koncentrata bakterijske frakcije obično nije potrebno, ali se može postići filtriranjem i/ili centrifugiranjem kako je opisano u odjeljku III.1.1.3. – 1.1.5.

2.1.5. Podijelite čisti ili koncentrirani ekstrakt uzorka na dva jednaka dijela. Jednu polovicu održavajte na temperaturi od 4 do 10 °C tijekom testiranja, a drugu polovicu pohraniti s 10-25 %-tnim (v/v) sterilnim glicerolom na temperaturi od – 16 do – 24 °C (tjednima) ili od – 68 do – 86 °C (mjesecima).

2.2. Testiranje

Vidjeti dijagram te opis testova i optimizirane protokole u odgovarajućim dodacima:

Selektivno izdvajanje (vidjeti odjeljak VI.A.4.)

Test IF (vidjeti odjeljak VI.A.5.)

Testovi PCR (vidjeti odjeljak VI.A.6.)

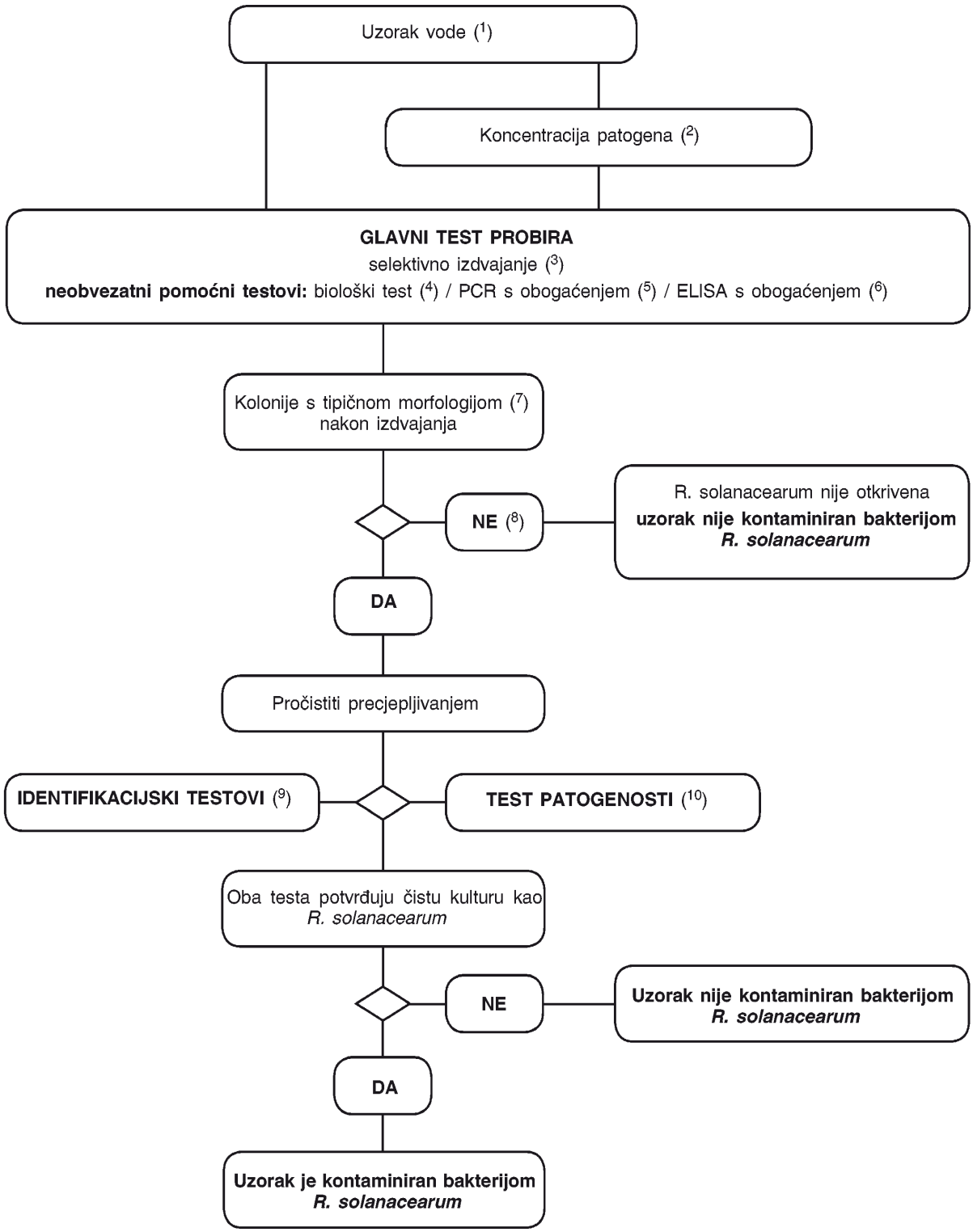
Test FISH (vidjeti odjeljak VI.A.7.)

Testovi ELISA (vidjeti odjeljak VI.A.8.)

Biološki test (vidjeti odjeljak VI.A.9.)

ODJELJAK IV.

1. **Postupak za otkrivanje i identifikaciju bakterije *R. solanacearum* u vodi**



([1]) Za preporučene postupke uzorkovanja vidjeti odjeljak IV.2.1.

([2]) Metode koncentriranja patogena opisane su u odjeljku IV.2.1. Koncentriranjem se povećavaju populacije i patogena i konkurentnih saprofitnih bakterija te se taj postupak preporučuje jedino ako neće onemogućiti test izdvajanja.

([3]) Test selektivnog izdvajanja opisan je u odjeljku VI.A.4.

([4]) Biološki test je opisan u odjeljku VI.A.9.

([5]) Metode obogaćivanja za test PCR opisane su u odjeljku VI.A.4.2. i odjeljku VI.A.6.

([6]) Metode obogaćivanja za test ELISA opisane su u odjeljku VI.A.4.2. i odjeljku VI.A.8.

([7]) Tipična morfologija kolonije opisana je u odjeljku II.3.d.

([8]) Uzgoj kulture može biti neuspješan zbog kompeticije ili inhibicije saprofitnih bakterija. Ako se sumnja da će velike populacije saprofitnih bakterija utjecati na pouzdanost izdvajanja, ponovite testove izdvajanja nakon što uzorak razrijedite u sterilnoj vodi.

([9]) Pouzdana identifikacija čistih kultura pretpostavljenih izolata bakterije *R. solanacearum* postiže se primjenom testova opisanih u odjeljku VI.B.

([10]) Test patogenosti opisan je u odjeljku VI.C.

2. **Metode za otkrivanje i identifikaciju bakterije *R. solanacearum* u vodi**

Načelo

Validirani postupak opisan u ovom odjeljku može se primijeniti za otkrivanje patogena u uzorcima površinske vode kao i za ispitivanje uzoraka tekućeg otpada nastalog pri preradi krumpira ili otpadnih voda. Međutim, važno je napomenuti da će očekivana osjetljivost detekcije ovisiti o supstratu. Na osjetljivost testa izdvajanja utječu populacije konkurentnih saprofitnih bakterija koje su općenito veće u otpadnim vodama nastalim pri preradi i obradi krumpira nego u površinskim vodama. Dok se može očekivati da će se dolje opisanim postupkom otkriti tek 10^3 stanica po litru površinske vode, osjetljivost otkrivanja u tekućem otpadu nastalom pri preradi krumpira i u otpadnim vodama bit će vjerojatno znatno niža. Stoga se preporučuje testirati otpadne vode poslije svakog postupka pročišćavanja (npr. sedimentiranja ili filtriranja) tijekom kojega se smanjuju populacije saprofitnih bakterija. Kada ocjenjujemo pouzdanost dobivenih negativnih rezultata, treba uzeti u obzir ograničenja u osjetljivosti postupka ispitivanja. Iako se ovaj postupak uspješno primjenjuje u istraživanjima čiji je cilj utvrditi prisutnost ili odsutnost patogena u površinskim vodama, treba biti svjestan njegovog ograničenja ako se koristi u sličnim istraživanjima tekućeg otpada nastalog pri preradi krumpira ili otpadnih voda.

2.1. Pripremanje uzoraka

Napomena:

— Otkrivanje bakterije *R. solanacearum* u površinskim vodama najpouzdanije je u kasno proljeće, ljeto i jesen kada je temperatura vode iznad 15 °C.

— Ponovljena uzorkovanja u različitim trenucima tijekom gore navedenih razdoblja na određenim mjestima uzorkovanja povećat će pouzdanost otkrivanja jer će se smanjiti učinci vremenskih promjena.

— Treba uzeti u obzir učinke obilnih padalina te zemljopisna obilježja tekućice kako bi se izbjegli značajni učinci razrjeđenja koji mogu prikriti prisutnost patogena.

— Uzorke površinske vode treba uzeti blizu biljaka domaćina ako one postoje.

2.1.1. Na odabranim mjestima uzorkovanja uzmite uzorke vode u sterilne cijevi ili boce za jednokratnu uporabu, po mogućnosti na dubini većoj od 30 cm i na udaljenosti od najviše 2 m od obale. U slučaju tekućeg otpada nastalog pri preradi krumpira i otpadnih voda, uzorke uzmite na mjestu njihovog ispusta. Preporučena veličina uzorka je 500 ml po mjestu uzorkovanja. Ako se žele manji uzorci, preporučuje se uzimanje uzoraka najmanje tri puta na svakom mjestu uzorkovanja, pri čemu se svaki uzorak sastoji od dva poduzorka od najmanje 30 ml. Za intenzivno istraživanje odaberite najmanje tri mjesta uzorkovanja na 3 km tekućice te osigurajte uzimanje uzoraka i iz pritoka te tekućice.

2.1.2. Uzorke prevozite u tamnim uvjetima pri niskim temperaturama (4 do 10 °C) i testirajte ih u roku od 24 sata.

2.1.3. Bakterijska frakcija može se, po potrebi, koncentrirati pomoću jedne od sljedećih metoda:

(a) centrifugirajte 30 do 50 ml poduzorka na 10 000 g 10 minuta (ili 7 000 g 15 minuta) po mogućnosti na temperaturi od 4 do 10 °C, uklonite supernatant i resuspendirajte talog u 1 ml pufera za talog (Dodatak 4.).

(b) Membranskom filtracijom (najmanja veličina pora 0,45 µm) nakon koje se filtar ispire u 5 do 10 ml pufera za talog te ispirak zadržava. Ova je metoda prikladna za veće količine vode koja sadrži mali broj saprofita.

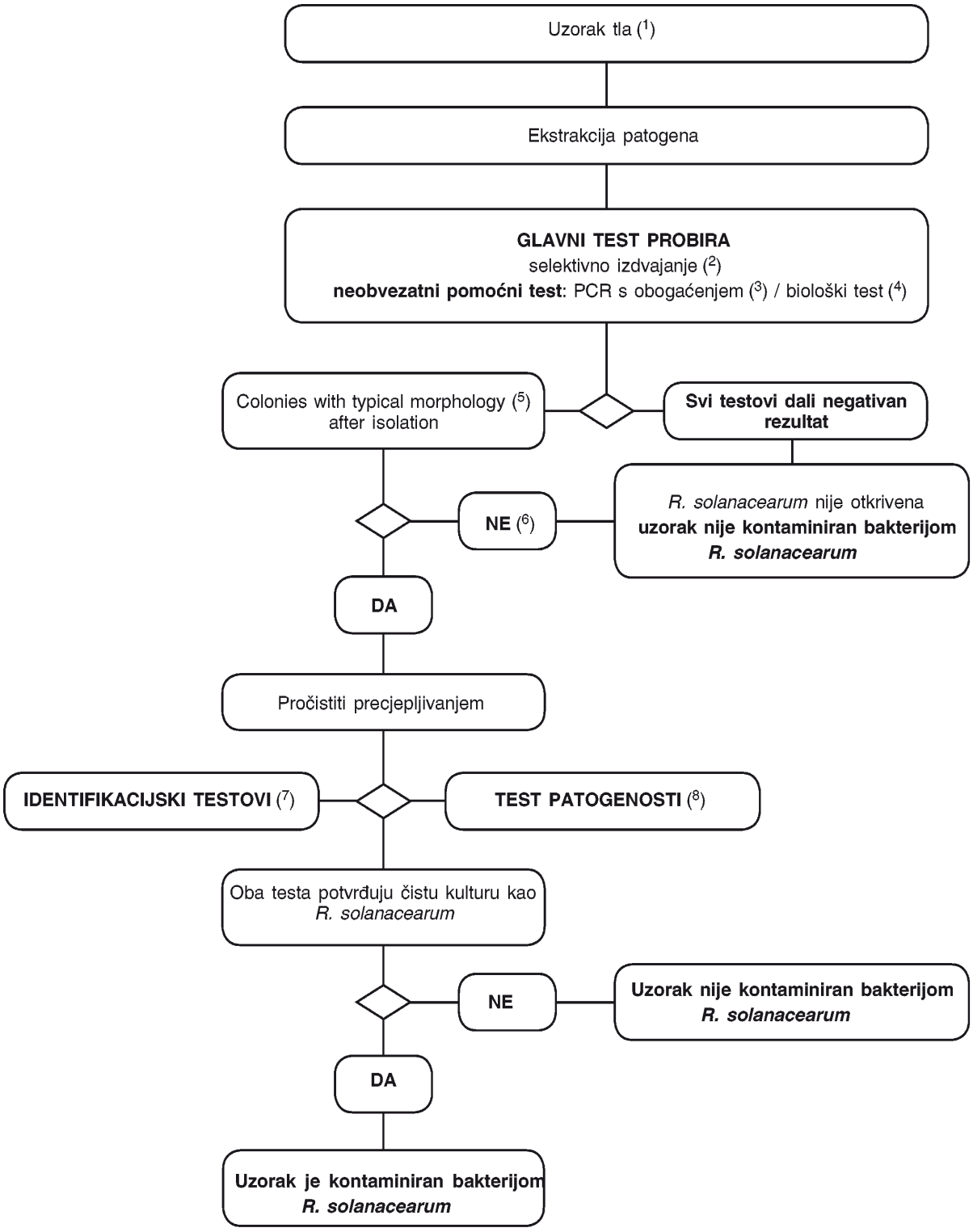
Koncentriranje se obično ne preporučuje za uzorke tekućeg otpada nastalog pri preradi krumpira ili uzorke otpadnih voda jer će veće populacije konkurentnih saprofitnih bakterija spriječiti otkrivanje bakterije R*alstonia solanacearum*.

2.2. Testiranje

Vidjeti dijagram te opis testova i optimizirane protokole u odgovarajućim dodacima.

ODJELJAK V.

1. **Postupak za otkrivanje i identifikaciju bakterije *R. solanacearum* u tlu**



([1]) Za preporučene postupke uzorkovanja vidjeti odjeljak IV.2.1.

([2]) Test selektivnog izdvajanja opisan je u odjeljku VI.A.4.

([3]) Metode obogaćivanja za test PCR opisane su u odjeljku VI.A.4.2. i odjeljku VI.A.6.

([4]) Biološki test je opisan u odjeljku VI.A.9.

([5]) Tipična morfologija kolonije opisana je u odjeljku II.3.d.

([6]) Uzgoj kulture može biti neuspješan zbog kompeticije ili inhibicije saprofitnih bakterija. Ako se sumnja da će velike populacije saprofitnih bakterija utjecati na pouzdanost izdvajanja, ponovite testove izdvajanja nakon što uzorak dodatno razrijedite.

([7]) Pouzdana identifikacija čistih kultura pretpostavljenih izolata bakterije *R. solanacearum* postiže se primjenom testova opisanih u odjeljku VI.B.

([8]) Test patogenosti opisan je u odjeljku VI.C.

2. **Metode za otkrivanje i identifikaciju bakterije *R. solanacearum* u tlu**

Načela

Validirani postupak opisan u ovom odjeljku može se primijeniti za otkrivanje patogena u uzorcima tla kao i za ispitivanje uzoraka krutog otpada nastalog pri preradi krumpira ili uzoraka kanalizacijskog mulja. Međutim, važno je napomenuti da ove metode nisu dovoljno osjetljive da bi jamčile otkrivanje manjih i/ili neravnomjerno raspršenih populacija bakterije *Ralstonia solanacearum* koje se mogu javljati u prirodno zaraženim uzorcima tih supstrata.

Treba uzeti u obzir ograničenja u osjetljivosti ovog postupka ispitivanja pri ocjenjivanju pouzdanosti dobivenih negativnih rezultata kao i kada ovaj postupak primjenjujemo u istraživanjima čiji je cilj utvrditi prisutnost ili odsutnost patogena u tlu ili mulju. Najpouzdaniji način utvrđivanja prisutnosti patogena u tlu na polju je taj da posadimo biljku domaćina koja je osjetljiva na taj patogen te pratimo hoće li doći do infekcije, ali čak ni ovom metodom neće se otkriti niske razine kontaminacije.

2.1. Pripremanje uzoraka

2.1.1. Uzorkovanje tla u polju treba obavljati u skladu s osnovnim načelima koja se primjenjuju kod uzorkovanja za ispitivanje nematoda. Sa 60 mjesta na svaka 0,3 ha uzmite 0,5 do 1 kg tla po uzorku, s dubine od 10 do 20 cm (ili na mreži od 7 × 7 metara). Ako se sumnja na prisutnost patogena, povećajte broj mjesta uzorkovanja na 120 na svakih 0,3 ha. Prije testiranja uzorke čuvajte na temperaturi od 12 do 15 °C. Uzorkovanje krutog otpada nastalog pri preradi krumpira ili uzorkovanje kanalizacijskog mulja obavite tako što ćete uzeti ukupno 1 kg na mjestima koja predstavljaju ukupnu količinu mulja koje treba ispitati. Svaki uzorak dobro promiješajte prije testiranja.

2.1.2. Dispergirajte poduzorke od 10 do 25 g tla ili mulja na rotacijskoj tresilici (250 o/min) u ekstrakcijskom puferu (Dodatak 4.) najdulje dva sata. Dodavanje 0,02 %-tnog sterilnog Tween-20 i 10 do 20 g sterilnog pijeska može, po potrebi, pridonijeti dispergiranju.

2.1.3. Suspenziju održavajte na temperaturi od 4 °C tijekom testiranja.

2.2. Testiranje

Vidjeti dijagram i opis testova u odgovarajućim dodacima.

ODJELJAK VI.

OPTIMIZIRANI PROTOKOLI ZA OTKRIVANJE I IDENTIFIKACIJU BAKTERIJE *R. SOLANACEARUM*

A. *DIJAGNOSTIČKI TESTOVI I TESTOVI ZA OTKRIVANJE*

1. **Test eksudacije na stabljici**

Vjerojatna prisutnost bakterije *R. solanacearum* u stabljikama uvelih biljaka krumpira, rajčice ili drugih biljaka domaćina može se utvrditi sljedećim jednostavnim testom: odrežite stabljiku neposredno iznad razine tla. Odrezani kraj stavite u epruvetu s čistom vodom. Pratite hoće li nakon nekoliko minuta iz prerezanih žilnih snopića početi spontano curiti karakteristične niti bakterijske sluzi.

2. **Otkrivanje zrnaca poli-β-hidroksibutirata (PHB)**

1. Na mikroskopskom stakalcu pripremite razmaz bakterijskog iscjetka iz zaraženog tkiva ili iz 48-satne kulture na hranjivoj podlozi YPGA ili SPA.

2. Za pozitivnu kontrolu pripremite razmaze soja biovara 2 bakterije *R. solanacearum* i, ako smatrate korisnim, za negativnu kontrolu razmaz soja za koji je poznato da je negativan na PHB.

3. Razmaze ostavite da se osuše na zraku i donju stranu svakog stakalca brzo povucite iznad plamena da se razmazi fiksiraju.

4. Obojite preparat ili nilskim plavilom (Nile Blue) ili sudanskim crnilom (Sudan Black) te promatrajte pod mikroskopom kako je opisano u daljnjem tekstu:

Test s nilskim plavilom:

(a) Prelijte svako stakalce s 1 %-tnom vodenom otopinom nilskog plavila A i inkubirajte 10 minuta na 55 °C.

(b) Ocijedite otopinu boje. Isperite kratko pod blagim mlazom vode iz slavine. Višak vode uklonite upijajućim papirom.

(c) Prelijte razmaz 8 %-tnom vodenom otopinom octene kiseline i inkubirajte jednu minutu na sobnoj temperaturi.

(d) Isperite kratko pod blagim mlazom vode iz slavine. Višak vode uklonite upijajućim papirom.

(e) Ponovo navlažite kapljicom vode i pokrijte pokrovnim stakalcem.

(f) Pregledajte obojeni razmaz pomoću epifluorescentnog mikroskopa na 450 nm, u imerzijskom ulju, uz povećanje od 600 do 1 000, koristeći imerzijski objektiv za ulje ili vodu.

(g) Promatrajte je li došlo do svijetlonarančaste fluorescencije zrnaca PHB-a. Također promatrajte pod normalnim svjetlom kako biste se uvjerili da su zrnca intracelularna i da je stanična morfologija tipična za bakteriju *R. solanacearum*.

Test sa sudanskim crnilom

(a) Prelijte svako stakalce 0,3 %-tnom otopinom sudanskog crnila B u 70 %-tnom etanolu i inkubirajte 10 minuta na sobnoj temperaturi.

(b) Ocijedite otopinu boje, kratko isperite pod mlazom vode iz slavine i višak vode uklonite upijajućim papirom.

(c) Stakalca nakratko umočite u ksilol te ih osušite na upijajućem papiru. *Oprez! Ksilol je opasan za zdravlje. Poduzmite potrebne sigurnosne mjere i radite u digestoru.*

(d) Prelijte stakalca 0,5 %-tnom (w/v) vodenom otopinom safranina i ostavite 10 sekundi na sobnoj temperaturi. *Oprez! Safranin je opasan za zdravlje. Poduzmite potrebne sigurnosne mjere i radite u digestoru.*

(e) Isperite pod blagim mlazom vode iz slavine, osušite na upijajućem papiru te pokrijte pokrovnim stakalcem.

(f) Pregledajte obojene razmaze pod mikroskopom koji koristi prolazno svjetlo, u uljnoj imerziji, uz povećanje od 1 000, koristeći imerzijski objektiv za ulje.

(g) Promatrajte uočavaju li se plavo-crno obojena zrnca PHB-a u stanicama *R. solanacearum* s ružičasto obojenim staničnim stjenkama.

3. **Serološki test aglutinacije**

Aglutinacija stanica bakterije *R. solanacearum* u bakterijskom iscjetku ili simptomatskim ekstraktima tkiva najbolje se opaža korištenjem validiranih protutijela (vidjeti Dodatak 3.) obilježenih odgovarajućim obojenim oznakama kao što su crvene stanice *Staphylococcus aureus* ili obojene čestice lateksa. Ako koristite pribor koji je dostupan na tržištu (vidjeti Dodatak 3.), slijedite upute proizvođača. U protivnom, primijenite sljedeći postupak:

(a) Pomiješajte kapljice suspenzije obilježenog protutijela i bakterijskog iscjetka (oko 5 µl svakog) na predmetnim stakalcima s više jažica.

(b) Pripremite pozitivne i negativne kontrole koristeći suspenzije *R. solanacearum* biovar 2 i heterolognog soja.

(c) Promatrajte hoće li doći do aglutinacije u pozitivnim uzorcima nakon 15 sekundi laganog miješanja.

4. **Selektivno izdvajanje**

4.1. Nasađivanje na selektivnu podlogu

Napomena: Prije nego ovu metodu prvi put primijenite, obavite prethodne testove kako biste osigurali ponovljivo otkrivanje 10^3 do 10^4 jedinica koje stvaraju kolonije bakterije *R. solanacearum* po ml, a koje su dodane ekstraktima uzoraka koji su ranije testirani s negativnim rezultatom.

Koristite primjereno validiranu selektivnu hranjivu podlogu kao što je SMSA (prilagođenu prema Elphinstone *et al.*, 1996; vidjeti Dodatak 2.).

Trebate dobro paziti da razlikujete *R. solanacearum* od drugih bakterija koje su sposobne stvarati kolonije na toj hranjivoj podlozi. Nadalje, kolonije *R. solanacearum* mogu pokazivati atipičnu morfologiju ako su ploče prenaseljene ili ako su prisutne antagonističke bakterije. Ako se sumnja na učinke kompeticije ili antagonizma, uzorak treba ponovno ispitati drugačijim testom.

Najveća osjetljivost detekcije ovom metodom može se očekivati ako se koriste svježe pripremljeni ekstrakti uzoraka. Međutim, ova se metoda može primjenjivati i na ekstraktima koji su bili pohranjeni pod glicerolom na temperaturi od – 68 do – 86 °C.

Za pozitivnu kontrolu pripremite decimalna razrjeđenja suspenzije od 10^6 CFU/ml virulentnog soja biovara 2 *R. solanacearum* (npr. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857). Kako bi se spriječila svaka mogućnost kontaminacije, pozitivne kontrole pripremite potpuno odvojeno od uzoraka koje ćete ispitivati.

Za svaku novopripremljenu seriju selektivne hranjive podloge treba, prije nego se upotrijebi za ispitivanje rutinskih uzoraka, provjeriti je li ona prikladna za rast patogena.

Kontrolni materijal testirajte na isti način kao i uzorke.

4.1.1. Primijenite odgovarajuću tehniku nasađivanja razrjeđenja kako biste osigurali da sve populacije saprofitnih bakterija koje stvaraju kolonije budu razrijeđene. Nanesite 50 – 100 µl po ploči ekstrakta uzorka i po svakom razrjeđenju.

4.1.2. Inkubirajte ploče na 28 °C. Očitajte ploče nakon 48 sati, a nakon toga svaki dan u razdoblju do šest dana. Tipične kolonije *R. solanacearum* na hranjivoj podlozi SMSA mliječno-bijele su boje, plosnate, nepravilnog oblika i tekuće, a nakon tri dana inkubacije sredina im postaje ružičasta do krvavo-crvena s unutarnjim prugama ili spiralama (vidjeti internetsku stranicu http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

Napomena: Na ovoj se hranjivoj podlozi ponekad stvaraju i atipične kolonije *R. solanacearum*. One mogu biti malene, okrugle, potpuno crvene boje i netekuće ili samo djelomično tekuće te ih je, stoga, teško razlikovati od saprofitnih bakterija koje stvaraju kolonije.

4.1.3. Pretpostavljene kolonije *R. solanacearum*, nakon što ste ih nanijeli ili razrijedili i nasadili na uobičajenu hranjivu podlogu, pročistite kako biste dobili izdvojene kolonije (vidjeti Dodatak 2.).

4.1.4. Kulture se kratko vrijeme mogu čuvati u sterilnoj vodi (pH 6 do 8, bez klora) na sobnoj temperaturi u tami ili duže vrijeme u prikladnom krioprotektoru na temperaturi od – 68 do – 86 °C ili liofilizirane.

4.1.5. Identificirajte pretpostavljene kulture (vidjeti odjeljak VI.B) i obavite test patogenosti (vidjeti odjeljak VI.C).

Tumačenje rezultata testa s nasađivanjem na selektivnu podlogu

Test s nasađivanjem na selektivnu podlogu je negativan ako se nakon šest dana ne uočavaju nikakve bakterijske kolonije ili ako se ne pronađu sumnjive kolonije tipične za *R. solanacearum*, pod uvjetom da se ne sumnja na inhibiciju zbog konkurencije ili antagonizma drugih bakterija i da su tipične kolonije *R. solanacearum* pronađene u pozitivnim kontrolama.

Test s nasađivanjem na selektivnu podlogu je pozitivan ako se izdvoje sumnjive kolonije *R. solanacearum*.

4.2. Postupak obogaćivanja

Upotrijebite validirano sredstvo za obogaćivanje kao što je modificirani bujon Wilbrink (vidjeti Dodatak 2.).

Ovaj se postupak može primijeniti da se selektivno povećaju populacije R. solanacearum *u ekstraktima uzoraka te da se poveća osjetljivost detekcije. Ovim se postupkom, također, učinkovito razrjeđuju inhibitori reakcije PCR (1:100). Treba, međutim, napomenuti da obogaćivanje* R. solanacearum *može biti neuspješno zbog kompeticije ili antagonizma saprofitnih organizama koji se često istodobno obogaćuju. Zbog toga može biti teško izdvojiti* R. solanacearum *iz kultura obogaćenih u bujonu. Pored toga, s obzirom da se populacije serološki srodnih saprofita mogu povećati, preporučuje se uporaba specifičnih monoklonskih protutijela umjesto poliklonskih protutijela ako će se primjenjivati test ELISA.*

4.2.1. Za obogaćivanje za test PCR prenesite 100 µl ekstrakta uzorka u 10 ml bujona za obogaćivanje (Dodatak 2.) koji je prethodno podijeljen u alikvote u epruvete ili staklenke bez DNK. Za obogaćivanje za test ELISA mogu se koristiti veći udjeli ekstrakta uzorka u bujonu (npr. 100 µl u 1,0 ml bujona za obogaćivanje).

4.2.2. Inkubirajte 72 sata na temperaturi od 27 do 30 °C sa ili bez protresivanja, s labavim poklopcem da se omogući prozračivanje.

4.2.3. Dobro promiješajte prije korištenja u testovima ELISA ili PCR.

4.2.4. S obogaćenim bujonom postupajte isto kao i s uzorkom(-cima) u gornjim testovima.

Napomena: Ako očekujete da će obogaćivanje *R. solanacearum* biti onemogućeno zbog velikih populacija određenih konkurentnih saprofitnih bakterija, bolje rezultate ćete možda dobiti ako ekstrakte uzoraka obogatite prije centrifugiranja ili drugih postupaka koncentriranja.

5. **Test IF**

Načelo

Test IF se preporučuje kao glavni test probira zbog njegove dokazane sposobnosti postizanja zahtijevanih pragova,.

Ako se test IF primjenjuje kao glavni test probira i ako se njime dobije pozitivan rezultat, mora se obaviti test izdvajanja, test PCR ili test FISH kao drugi test probira. Ako se test IF primjenjuje kao drugi test probira i ako se njime dobije pozitivan rezultat, potrebno je obaviti daljnje testove prema dijagramu da bi se analiza završila.

Napomena: Koristite potvrđeni izvor protutijela za *R. solanacearum* (vidjeti internetsku stranicu http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Preporučljivo je da se titar odredi za svaku novu seriju protutijela. Titar se definira kao najveće razrjeđenje kod kojeg dolazi do optimalne reakcije pri testiranju suspenzije koja sadrži 10^5 do 10^6 stanica po ml homolognog soja bakterije *R. solanacearum* uz korištenje konjugata fluorescein-izotiocijanata (FITC) prema preporukama proizvođača. Svi potvrđeni poliklonski antiserumi imali su titar IF najmanje 1:2 000. Tijekom testiranja, treba koristiti protutijela u radnim razrjeđenjima koja su blizu ili jednaka titru.

Test treba obaviti na svježe pripremljenim ekstraktima uzoraka. On se, po potrebi, može uspješno obaviti i na ekstraktima koji su bili pohranjeni na temperaturi od – 68 do – 86 °C pod glicerolom. Glicerol se može ukloniti sa uzorka dodavanjem 1 ml pufera za talog (Dodatak 4.), ponovnim 15-minutnim centrifugiranjem na 7 000 g i resuspendiranjem u jednakom volumenu pufera za talog. To je rijetko potrebno, naročito ako su uzorci plamenom fiksirani na stakalca.

Za pozitivnu kontrolu pripremite odvojena stakalca s homolognim sojem ili nekim drugim referentnim sojem bakterije *R. solanacearum* suspendiranim u ekstraktu krumpira kako je navedeno u Dodatku 3B te, po slobodnoj volji, u puferu.

Kao sličnu kontrolu na istom stakalcu trebalo bi, po mogućnosti, koristiti prirodno zaraženo tkivo (održavano liofilizacijom ili zamrzavanjem na – 16 do – 24 °C).

Za negativnu kontrolu mogu se upotrijebiti alikvote ekstrakta uzoraka koji su u ranijem testiranju na *R. solanacearum* pokazali negativan rezultat.

U Dodatku 3. navedeni su standardizirani pozitivni i negativni kontrolni materijali koji se mogu upotrebljavati u ovom testu.

Koristite predmetna stakalca s više jažica, po mogućnosti s 10 jažica promjera najmanje 6 mm.

Kontrolni materijal testirajte jednako kao i uzorke.

5.1. Pripremite stakalca za testiranje prema jednom od sljedećih postupaka:

i. Za talog s relativno malo škroba

U prvu jažicu pipetom odmjerite standardni volumen (15 µl je dovoljno za jažice promjera 6 mm – za veće jažice povećajte volumen) razrjeđenja od 1/100 resuspendiranog taloga krumpira. Potom u ostale jažice u istom redu pipetom odmjerite slični volumen nerazrijeđenog (1/1) taloga. Drugi se red može koristiti kao duplikat ili za drugi uzorak kako je prikazano na slici 1.

ii. Za ostali talog:

Pripremite decimalna razrjeđenja (1/10, 1/100) resuspendiranog taloga u puferu za talog. U jedan red jažica pipetom odmjerite standardni volumen (15 µl je dovoljno za jažice promjera 6 mm – za veće jažice povećajte volumen) resuspendiranog taloga i svakog razrjeđenja. Drugi se red može koristiti kao duplikat ili za drugi uzorak kako je prikazano na slici 2.

5.2 Ostavite da se kapljice osuše na sobnoj temperaturi ili ih zagrijavajte do temperature od 40 do 45 °C. Fiksirajte bakterijske stanice na stakalce bilo zagrijavanjem (15 minuta na 60 °C), plamenom, 95 %-tnim etanolom ili prema posebnim uputama dobavljača protutijela.

Prije daljnjih testiranja, fiksirana se stakalca mogu, po potrebi, kratko vrijeme (najviše do tri mjeseca) čuvati zamrznuta u suhom spremniku.

5.3. IF postupak

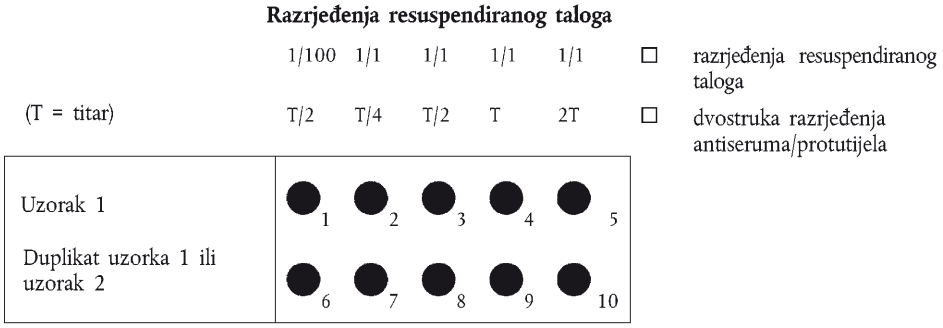
i. U skladu s postupkom za pripremu stakalaca za testiranje kako je opisan pod 5.1.i.:

Pripremite niz dvostrukih razrjeđenja. Prva jažica mora imati 1/2 titra (T/2), a ostale 1/4 titra (T/4), 1/2 titra (T/2), titar (T) i dvostruki titar (2T).

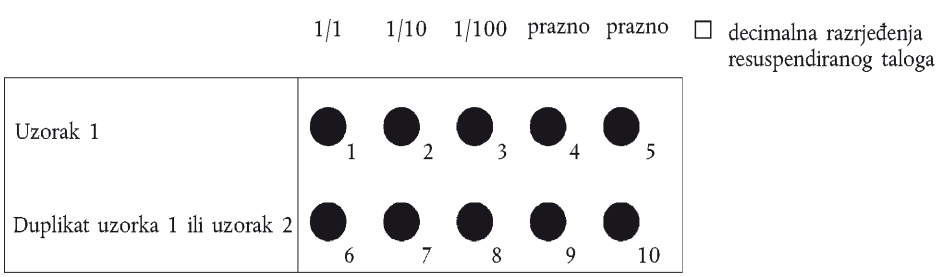
ii. U skladu s postupkom za pripremu stakalaca za testiranje kako je opisan pod 5.1.ii.:

Pripremite radno razrjeđenje (RR) antiseruma u IF puferu. Radno razrjeđenje utječe na specifičnost.

Slika 1. Priprema stakalca u skladu s točkama 5.1.i. i 5.3.i.



Slika 2. Priprema stakalca u skladu s točkama 5.1.ii. i 5.3.ii.



5.3.1. Posložite stakalca na navlaženi upijajući papir. Svaku jažicu prekrijte razrjeđenjem protutijela. Volumen protutijela koji se stavlja u pojedinu jažicu mora biti jednak volumenu stavljenog ekstrakta.

Slijedite sljedeći postupak ako nema posebnih uputa dobavljača protutijela:

5.3.2. Inkubirajte stakalca na vlažnom papiru pod pokrivalom 30 minuta na sobnoj temperaturi (18 do 25 °C).

5.3.3. Otresite kapljice sa svakog stakalca i pažljivo ih isperite IF puferom. Namočite ih na 5 minuta u IF pufer-Tween (Dodatak 4.) i nakon toga u IF pufer. Pazite da ne dođe do stvaranja aerosola ili prijenosa kapljica jer bi to moglo dovesti do unakrsne kontaminacije. Suvišnu vlagu lagano uklonite upijajućim papirom.

5.3.4. Posložite stakalca na navlaženi papir. Pretraživane jažice prekrijte razrijeđenim FITC konjugatom koji se koristi za određivanje titra. Volumen konjugata nanesenog u jažice mora biti jednak volumenu nanesenog antitijela.

5.3.5. Inkubirajte pokrivena stakalca na vlažnom papiru 30 minuta na sobnoj temperaturi (18 do 25 °C).

5.3.6. Otresite kapljice konjugata sa stakalca. Isplahnite i operite kako je gore opisano (5.3.3).

Pažljivo uklonite višak vlage.

5.3.7. U svaku jažicu pipetom nanesite 5-10 µl 0,1 M glicerola s fosfatnim puferom (Dodatak 4.) ili sredstvo protiv blijeđenja koje je dostupno na tržištu te stavite pokrovno stakalce.

5.4. Očitavanje IF testa

5.4.1. Pregledajte pretraživana stakalca pod epifluorescentnim mikroskopom s odgovarajućim filtarima za pobuđivanje FITC, u uljnoj imerziji uz povećanje od 500-1 000. Pregledajte svaku jažicu duž dva okomita promjera i duž vanjskog ruba. Za uzorke koji pokazuju mali broj stanica ili ih uopće ne pokazuju pregledajte najmanje 40 mikroskopskih polja.

Najprije pregledajte stakalce s pozitivnom kontrolom. Stanice moraju snažno fluorescirati i moraju biti potpuno obojene na utvrđenom titru protutijela ili radnog razrjeđenja. U slučaju da kod obojenosti dođe do odstupanja, mora se ponoviti test IF (odjeljak VI.A.5).

5.4.2. Pregledajte postoje li u jažicama svijetle fluorescirajuće stanice s karakterističnom morfologijom bakterije *R. solanacearum* (vidjeti internetsku stranicu http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Jačina fluorescencije mora biti jednaka kao i kod pozitivnog kontrolnog soja pri jednakom razrjeđenju protutijela. Stanice s nepotpunim obojenjem ili sa slabom fluorescencijom moraju se zanemariti.

Test se mora ponoviti kad god se sumnja na kontaminaciju. Sumnja se može javiti ako sva stakalca u seriji pokazuju pozitivne stanice zbog kontaminacije pufera ili ako su pozitivne stanice pronađene (izvan jažica) na površini stakalca.

5.4.3. Postoji nekoliko problema vezanih uz specifičnost testa imunofluorescencije. U koncentriranom ekstraktu krumpirovih stolona ili dijelova stabljika mogu se pojaviti populacije fluorescirajućih stanica s atipičnom morfologijom i saprofitne bakterije koje izazivaju unakrsnu reakciju i koje su po veličini i morfologiji slične bakteriji *R. solanacearum*.

5.4.4. U obzir uzmite samo fluorescirajuće stanice tipične veličine i morfologije u titru ili radnom razrjeđenju protutijela kako je opisan u točki 5.3.

5.4.5. Tumačenje rezultata testa IF

i. Ako nađete svijetle fluorescirajuće stanice s karakterističnom morfologijom, odredite prosječni broj tipičnih stanica po mikroskopskom polju i izračunajte broj tipičnih stanica po ml resuspendiranog taloga (Dodatak 5.).

Nalaz testa IF je pozitivan za uzorke koji imaju najmanje 5×10^3 tipičnih stanica po ml resuspendiranog taloga. Uzorak se smatra potencijalno kontaminiranim i potrebni su daljnji testovi.

ii. Nalaz testa IF je negativan za uzorke koji imaju manje od 5×10^3 stanica po ml resuspendiranog taloga te se uzorak smatra negativnim. Nisu potrebni daljnji testovi.

6. **Testovi PCR**

Načela

Ako se test PCR primjenjuje kao glavni test probira i ako se njime dobije pozitivan rezultat, mora se obaviti test izdvajanja ili test IF kao drugi obvezni test probira. Ako se test PCR primjenjuje kao drugi test probira i ako se njime dobije pozitivan rezultat, za postavljanje konačne dijagnoze treba obaviti daljnje testove prema dijagramu.

Potpuna primjena ove metode kao glavnog testa probira preporučuje se samo ako ste stručno osposobljeni.

Napomena: Preliminarna ispitivanja pomoću ove metode trebaju omogućiti ponovljivo otkrivanje 10^3 do 10^4 stanica bakterije *R. solanacearum* po ml, koje su dodane ekstraktima uzoraka koji su ranije testirani s negativnim rezultatom. Kako bi se postigao najveći stupanj osjetljivosti i specifičnosti u svim laboratorijima, mogu biti potrebni pokusi za optimizaciju.

Koristite potvrđene reagense i protokole za PCR (vidjeti Dodatak 6.). Poželjno je odabrati metodu s unutarnjom kontrolom.

Poduzmite odgovarajuće mjere opreza kako biste spriječili kontaminacija uzorka ciljnom DNK. Da bi se spriječila kontaminacija ciljnom DNK, test PCR trebali bi obavljati iskusni stručnjaci u specijaliziranim laboratorijima za molekularnu biologiju.

Negativne kontrole (za ekstrakciju DNK i postupke PCR) treba uvijek obrađivati kao zadnje uzorke u postupku kako bi se vidjelo je li došlo do prijenosa DNK.

U PCR test treba uključiti sljedeće negativne kontrole:

— ekstrakt uzorka koji je u ranijem testiranju na *R. solanacearum* pokazao negativan rezultat

— kontrole pufera korištenog za ekstrakciju bakterije i DNK iz uzorka

— reakcijsku smjesu za PCR

Treba uključiti sljedeće pozitivne kontrole:

— Alikvote resuspendiranih taloga u koje je dodana bakterija *R. solanacearum* (za pripremu vidjeti Dodatak 3. B).

— Suspenziju od 10^6 stanica/ml bakterije *R. solanacearum* u vodi iz virulentnog izolata (npr. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; vidjeti Dodatak 3. B).

— Ako je moguće, u testu PCR upotrijebite i DNK ekstrahiranu iz pozitivnih kontrolnih uzoraka.

Da bi se izbjegla moguća kontaminacija, pozitivne kontrole pripremite prostorno odvojeno od pretraživanih uzoraka.

Ekstrakti uzoraka moraju sadržavati što je moguće manje zemlje. Ako namjeravate primjenjivati protokole PCR, u nekim bi slučajevima, stoga, bilo bi preporučljivo pripremiti ekstrakte od opranih krumpira.

U Dodatku 3. navedeni su standardizirani pozitivni i negativni kontrolni materijali koji se mogu koristiti u ovim testovima.

6.1. Metode pročišćavanja DNK

Upotrijebite uzorke za pozitivnu i negativnu kontrolu kako je gore opisano (vidjeti Dodatak 3.).

Testirajte kontrolni materijal na isti način kao i uzorak(-ke).

Postoje različite metode za pročišćavanje ciljne DNK iz supstrata složenih uzoraka, kojima se uklanjaju inhibitori PCR-a i druge enzimske reakcije te se u ekstraktu uzorka koncentrira ciljna DNK. Sljedeća je metoda optimizirana za korištenje s validiranim metodama PCR koje su navedene u Dodatku 6.

(a) Metoda prema Pastriku (2000)

1) Pipetom odmjerite 220 µl pufera za lizu (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0[, 1 mM EDTA [pH 8,0]) u epruvetu Eppendorf od 1,5 ml.

2) Dodajte 100 µl ekstrakta uzorka i stavite u blok za zagrijavanje ili vodenu kupelj na 95 °C 10 minuta.

3) Stavite na led 5 minuta.

4) Dodajte 80 µl osnovne otopine lizozima (50 mg lizozima na ml u 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) te inkubirajte 30 minuta na 37 °C.

5) Dodajte 220 µl otopine A Easy DNA® (Invitrogen), dobro promiješajte na vortex miješalici i inkubirajte 30 minuta na 65 °C.

6) Dodajte 100 µl otopine B Easy DNA® (Invitrogen), snažno miješajte na vortex miješalici sve dok precipitat ne bude slobodno kružio po epruveti i dok uzorak ne bude potpuno viskozan.

7) Dodajte 500 µl kloroforma te miješajte na vortex miješalici dok se viskoznost ne poveća i smjesa postane homogena.

8) Centrifugirajte na 15 000 g 20 minuta na 4 °C da se odijele faze i stvori interfaza.

9) Gornju fazu prenesite u novu epruvetu Eppendorf.

10) Dodajte 1 ml 100 %-tnog etanola (– 20 °C), kratko promiješajte na vortex miješalici i inkubirajte na ledu 10 minuta.

11) Centrifugirajte na 15 000 g 20 minuta na 4 °C te uklonite etanol iz taloga.

12) Dodajte 500 µl 80 %-tnog etanola (– 20 °C) te promiješajte tako da okrenete epruvetu.

13) Centrifugirajte na 15 000 g 10 minuta na 4 °C, sačuvajte talog, a etanol uklonite.

14) Ostavite talog da se suši na zraku ili u vakuumskoj centrifugi (DNA speed vac).

15) Resuspendirajte talog u 100 µl ultra čiste vode i ostavite na sobnoj temperaturi najmanje 20 minuta.

16) Pohranite na – 20 °C dok ne bude potrebno za PCR.

17) Centrifugiranjem izdvojite mogući bijeli precipitat te za PCR upotrijebite 5 µl supernatanta koji sadrži DNK.

(b) Druge metode

Mogu se primijeniti i druge metode ekstrakcije DNK, npr. Qiagen DNeasy Plant Kit, pod uvjetom da je dokazano da su jednako učinkovite u pročišćavanju DNK iz kontrolnih uzoraka koji sadrže 10^3 do 10^4 patogenih stanica na ml.

6.2. PCR

6.2.1. Pripremite kalupe (template) za ispitivanje i kontrolu za PCR prema potvrđenim protokolima (odjeljak VI.A.6). Pripremite jedno decimalno razrjeđenje ekstrakta DNK iz uzorka (1:10 u ultra čistoj vodi).

6.2.2. U nekontaminiranom prostoru pripremite odgovarajuću reakcijsku smjesu za PCR prema objavljenim protokolima (Dodatak 6.). Preporučuje se da, ako je moguće, koristite protokol za multipleks PCR koji uključuje i unutarnju kontrolu PCR-a.

6.2.3. Prema protokolu za PCR (Dodatak 6.) dodajte 2-5 µl ekstrakta DNK na 25 µl reakcijske smjese za PCR u sterilne epruvete za PCR.

6.2.4. Uključite i uzorak za negativnu kontrolu koji sadrži samo reakcijsku smjesu za PCR te, umjesto uzorka, dodajte isti izvor ultra čiste vode koji je korišten za pripremu reakcijske smjese za PCR.

6.2.5. Stavite epruvete u uređaj za PCR (thermal cycler) koji je korišten u preliminarnom ispitivanju te primijenite optimizirani program PCR (Dodatak 6.).

6.3. Analiza produkta PCR-a

6.3.1. Elektroforezom na agaroznom gelu razdvojite umnožene produkte PCR-a. Najmanje 12 µl reakcijske smjese umnožene DNK iz svakog uzorka, pomiješane s 3 µl pufera za nanošenje (Dodatak 6.), nanesite na 2,0 %-tni (w/v) agarozni gel u tris-acetatnom EDTA puferu (TAE) (Dodatak 6.), uz napon od 5 do 8 V na cm. Upotrijebite odgovarajući biljeg DNK, npr. ljestvicu 100 bp.

6.3.2. Otkrijte vrpce DNK bojenjem etidijevim bromidom (0,5 mg/l) 30 do 60 minuta poduzimajući pri tomu odgovarajuće mjere opreza za rad s mutagenim tvarima.

6.3.3. Obojeni gel promatrajte pod kratkovalnom UV transiluminacijom (λ = 302 nm) i tražite umnožene produkte PCR-a očekivane veličine (Dodatak 6.) te ih dokumentirajte.

6.3.4. Za svaki novi nalaz/slučaj provjerite autentičnost umnoženog produkta PCR-a analizom s restrikcijskim enzimima na uzorku preostalih umnoženih DNK i to inkubacijom pri optimalnoj temperaturi i u optimalnom vremenu s odgovarajućim enzimom i puferom (vidjeti Dodatak 6.). Razgrađene fragmente razdvojite elektroforezom na agaroznom gelu kako je gore navedeno te pod UV transiluminacijom, nakon bojenja etidijevim bromidom, promatrajte karakteristični uzorak fragmenta nakon restrikcije te usporedite s pozitivnom kontrolom prije i poslije digestije.

Tumačenje rezultata testa PCR

Test PCR je negativan ako u pretraživanom uzorku nije otkriven produkt PCR-a očekivane veličine koji je specifičan za bakteriju *R. solanacearum*, ali je otkriven u svim pozitivnim kontrolnim uzorcima (kod multipleks PCR-a s početnicama unutarnje kontrole koje su specifične za biljku: u dotičnom se uzorku mora umnožiti drugi produkt PCR-a očekivane veličine).

Test PCR je pozitivan ako je otkriven produkt PCR-a koji je specifičan za bakteriju *R. solanacearum* i koji je očekivane veličine i restrikcijskog uzorka, pod uvjetom da nije umnožen ni iz jednog uzorka za negativnu kontrolu. Pouzdanu potvrdu pozitivnog rezultata možete dobiti i ponavljanjem testa s drugim skupom početnica za PCR (Dodatak 6.).

Napomena: Može se sumnjati da je došlo do inhibicije PCR-a ako se iz uzorka za pozitivnu kontrolu koji sadrži *R. solanacearum* u vodi dobije očekivani produkt, a iz pozitivnih kontrola s *R. solanacearum* u ekstraktu krumpira dobiju negativni rezultati. U multipleks PCR protokolima s unutarnjim kontrolama za PCR, inhibicija reakcije je indicirana ako nije dobiven nijedan od dva produkta.

Ako se iz jedne ili više negativnih kontrola dobije očekivani produkt umnažanja, može se sumnjati da je došlo do kontaminacije.

7. **Test FISH**

Načelo

Ako se test FISH primjenjuje kao prvi test probira i ako se njime dobije pozitivan rezultat, mora se obaviti test izdvajanja ili test IF kao drugi obvezni test probira. Ako se test FISH primjenjuje kao drugi test probira i ako se njime dobije pozitivan rezultat, za postavljanje konačne dijagnoze treba obaviti daljnje testove prema dijagramu.

Napomena: Koristite potvrđene oligo-sonde specifične za bakteriju *R. solanacearum* (vidjeti Dodatak 7.). Preliminarna ispitivanja pomoću ove metode trebaju omogućiti ponovljivo otkrivanje najmanje 10^3 do 10^4 stanica bakterije *R. solanacearum* po ml koje su dodane ekstraktima uzoraka koji su ranije testirani s negativnim rezultatom.

Sljedeći je postupak najbolje obavljati na svježe pripremljenim ekstraktima uzoraka, ali se može uspješno primijeniti i na ekstraktu uzorka koji je bio pohranjeni pod glicerolom na temperaturi od – 16 do – 24 °C ili od – 68 do – 86 °C.

Za negativnu kontrolu upotrijebite alikvote ekstrakta uzoraka koji su u ranijem testiranju na *R. solanacearum* pokazali negativan rezultat.

Za pozitivnu kontrolu pripremite suspenzije koje sadrže 10^5 do 10^6 stanica/ml bakterije *R. solanacearum* biovar 2 (npr. soj NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; vidjeti Dodatak 3.) iz kulture stare 3 – 5 dana. Pripremite odvojena stakalca za pozitivnu kontrolu s homolognim sojem ili nekim drugim referentnim sojem bakterije *R. solanacearum* suspendiranim u ekstraktu krumpira kako je navedeno u Dodatku 3. B.

Korištenje eubakterijske oligo-sonde obilježene FITC-om omogućuje kontrolu procesa hibridizacije jer će se obojiti sve eubakterije koje su prisutne u uzorku.

U Dodatku 3. A navedeni su standardizirani pozitivni i negativni kontrolni materijali koji se mogu upotrebljavati u ovom testu.

Kontrolni materijal testirajte jednako kao i uzorke.

7.1. Fiksiranje ekstrakta krumpira

Sljedeći se protokol temelji na Wullings *et al.* (1998):

7.1.1. Pripremite otopinu za fiksiranje (vidjeti Dodatak 7.).

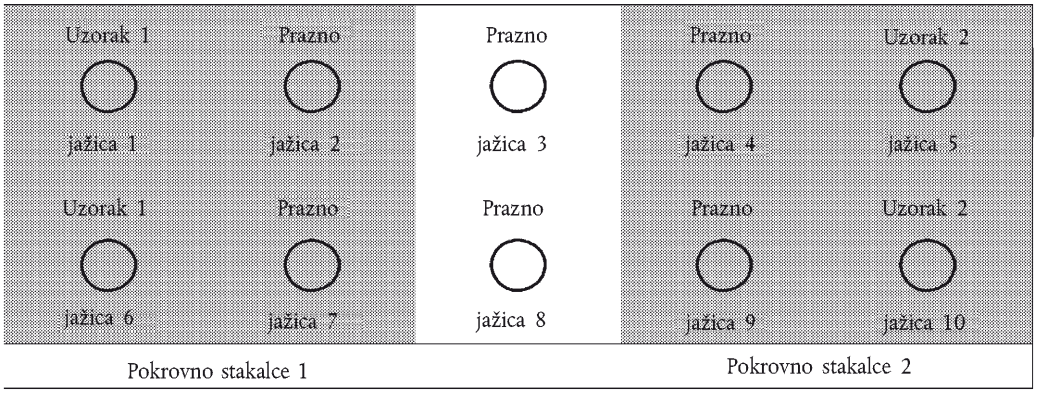
7.1.2. Pipetom odmjerite 100 µl svakog ekstrakta uzorka u epruvetu Eppendorf te centrifugirajte 7 minuta na 7 000 g.

7.1.3. Uklonite supernatant i rastopite talog u 200 µl fiksativa pripremljenog prije manje od 24 sata. Promiješajte na vortex miješalici i inkubirajte jedan sat u hladnjaku.

7.1.4. Centrifugirajte 7 minuta na 7 000 g, uklonite supernatant te resuspendirajte talog u 75 µl 0,01 PB (vidjeti Dodatak 7.).

7.1.5. U jažice čistog stakalca nanesite 16 µl fiksiranih suspenzija kako je prikazano na slici 7.1. Na svako stakalce nanesite dva različita uzorka, nerazrijeđena i upotrijebite 10 µl za pripremanje razrjeđenja 1:100 (u 0,01 M PB). Preostalu otopinu uzorka (49 µl) možete pohraniti na – 20 °C nakon dodavanja jednog volumena 96 %-tnog etanola. Ako test FISH trebate ponoviti, centrifugiranjem uklonite etanol i dodajte jednaki volumen 0,01 PB (promiješati u vortex miješalici).

Slika 7.1. Shema stakalca za test FISH



7.1.6 Stakalca osušite na zraku (ili u sušioniku na 37 °C) te ih fiksirajte plamenom.

U ovoj se fazi postupak može prekinuti i nastaviti sljedeći dan. Stakalca se trebaju pohraniti na sobnoj temperaturi u suhom prostoru bez prašine.

7.2. Hibridizacija

7.2.1. Dehidrirajte stanice uzastopnim jednominutnim uranjanjem u 50 %-tni, 80 %-tni i 90 %-tni etanol. Stakalca postavite na držač i osušite na zraku.

7.2.2. Pripremite vlažnu inkubacijsku komoru tako što ćete dno hermetičke kutije prekriti upijajućim ili filtrirnim papirom namočenim u 1x hybmix (Dodatak 7.). Kutiju prethodno inkubirajte u hibridizacijskoj peći najmanje 10 minuta na 45 °C.

7.2.3. Nanesite 10 µl otopine za hibridizaciju (Dodatak 7.) u osam jažica (jažice 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 i 10; vidjeti sliku 7.1) svakog stakalca, a dvije središnje jažice (3 i 8) ostavite prazne.

7.2.4. Prve i zadnje četiri jažice pokrijte pokrovnim stakalcem (24 × 24 mm) pazeći pri tom da u jažicama ne ostane zraka. Stavite stakalca u prethodno zagrijanu vlažnu komoru i hibridizirajte pet sati u pećnici na 45 °C u tami.

7.2.5. Pripremite tri posude koje sadrže 1 l Milli Q vode (za uporabu u molekularnoj biologiji), 1 l 1x hybmixa (334 ml 3x hybmixa i 666 ml Milli Q vode) i 1 l 1/8x hybmixa (42 ml 3x hybmixa i 958 ml Milli Q vode). Svaku posudu prethodno inkubirajte u vodenoj kupelji na 45 °C.

7.2.6. Uklonite pokrovna stakalca, a predmetna stakalca stavite na držač.

7.2.7. Višak sonde isperite inkubiranjem 15 minuta na 45 °C u posudi s 1x hybmixa.

7.2.8. Prenesite držač stakalaca u otopinu za pranje od 1/8 hybmixa i inkubirajte još 15 minuta.

7.2.9. Stakalca nakratko uronite u vodu Milli Q te ih stavite na filtrirni papir. Višak vlage uklonite tako što ćete površinu lagano pokriti filtrirnim papirom. U svaku jažicu pipetom odmjerite 5 do 10 µl zaštitne otopine protiv blijeđenja (npr. Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA ili ekvivalentni) te cijelo predmetno stakalce pokrijte velikim pokrovnim stakalcem (24 × 60 mm).

7.3. Očitavanje testa FISH

7.3.1. Stakalca odmah promatrajte pomoću epifluorescentnog mikroskopa u uljnoj imerziji, uz povećanje od 639 ili 1 000 ×. S filtrom prikladnim za fluorescein-izotiocijanat (FITC), eubakterijske stanice (uključujući većinu gram negativnih stanica) u uzorku se vide kao fluorescentno zelene. Uporabom filtra za tetrametilrodamin-5-izotiocijanat stanice bakterije *R. solanacearum*, obojene s Cy3, vide se kao fluorescentno crvene. Usporedite morfologiju stanice s morfologijom pozitivnih kontrola. Stanice moraju biti svijetlo flourescentne i u cijelosti obojene. Ako dođe do odstupanja u obojenosti, test FISH (odjeljak VI.A.7) mora se ponoviti. Pregledajte svaku jažicu duž dva okomita promjera i duž vanjskog ruba. Za uzorke koji pokazuju mali broj stanica ili ih uopće ne pokazuju pregledajte najmanje 40 mikroskopskih polja.

7.3.2. Pregledajte postoje li u pretraživanim jažicama svijetle fluorescirajuće stanice s karakterističnom morfologijom bakterije *R. solanacearum* (vidjeti internetsku stranicu http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Jačina fluorescencije mora biti jednaka ili bolja nego kod pozitivnog kontrolnog soja. Stanice s nepotpunim obojenjem ili sa slabom fluorescencijom moraju se zanemariti.

7.3.3. Test se mora ponoviti kad god se sumnja na kontaminaciju. Sumnja se može javiti ako sva stakalca u seriji pokazuju pozitivne stanice zbog kontaminacije pufera ili ako su pozitivne stanice pronađene (izvan jažica) na površini stakalca.

7.3.4. Postoji nekoliko problema vezanih uz specifičnost testa FISH. U koncentriranom ekstraktu krumpirovih stolona i dijelova stabljika mogu se pojaviti, iako rjeđe nego kod testa IF, populacije fluorescirajućih stanica s atipičnom morfologijom i saprofitne bakterije koje su po veličini i morfologiji slične bakteriji *R. solanacearum*.

7.3.5. U obzir uzmite samo fluorescirajuće stanice tipične veličine i morfologije.

7.3.6. Tumačenje rezultata testa FISH

i. Rezultati testa FISH smatraju se valjanim ako se primjenom filtra FITC opaze zeleno fluorescirajuće stanice čija je veličina i morfologija tipična za bakteriju *R. solanacearum* i ako se primjenom filtra za rodamin opaze zeleno fluorescirajuće stanice, i to u svim pozitivnim kontrolama i ni u jednoj negativnoj kontroli. Ako se pronađu svijetle fluorescirajuće stanice s karakterističnom morfologijom, odredite prosječni broj tipičnih stanica po mikroskopskom polju i izračunajte broj tipičnih stanica po ml resuspendiranog taloga (Dodatak 4.). Uzorci s najmanje 5×10^3 tipičnih stanica po ml resuspendiranog taloga smatraju se potencijalno kontaminiranima. Potrebni su daljnji testovi. Uzorci s manje od 5×10^3 tipičnih stanica po ml resuspendiranog taloga smatraju se negativnima.

ii. Test FISH je negativan ako se primjenom filtra za rodamin ne uoče snažno fluorescirajuće crvene stanice čija je veličina i morfologija tipična za bakteriju *R. solanacearum*, pod uvjetom da se primjenom filtra za rodamin uoče tipične snažno fluorescirajuće crvene stanice u preparatima pozitivne kontrole.

8. **Testovi ELISA**

Načelo

Zbog relativno niske osjetljivosti, ELISA se može primijeniti samo kao neobavezni dodatni test pored testova IF, PCR ili FISH. Ako se primjenjuje DAS ELISA, obvezno je obogaćivanje i uporaba monoklonskih protutijela (vidjeti internetsku stranicu http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Obogaćivanje uzoraka prije primjene testa ELISA može biti korisno u svrhu povećanja osjetljivosti testa, ali može biti neuspješno zbog kompeticije ostalih organizama u uzorku.

Napomena: Koristite potvrđeni izvor protutijela za *R. solanacearum* (vidjeti internetsku stranicu http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Preporučljivo je da se titar odredi za svaku novu seriju protutijela. Titar se definira kao najveće razrjeđenje kod kojeg dolazi do optimalne reakcije pri testiranju suspenzije koja sadrži 10^5 do 10^6 stanica/ml homolognog soja bakterije *R. solanacearum* uz korištenje odgovarajućih konjugata sekundarnih protutijela prema preporukama proizvođača. Tijekom testiranja, treba koristiti protutijela u radnim razrjeđenjima koja su blizu ili jednaka titru formulacije dostupne na tržištu.

Odredite titar protutijela na suspenziji od 10^5 do 10^6 stanica po ml homolognog soja bakterije *R. solanacearum*.

Za negativnu kontrolu koristite ekstrakt uzorka koji je u ranijem testiranju na *R. solanacearum* pokazao negativan rezultat i suspenziju bakterije, koja ne izaziva unakrsnu reakciju, u fiziološkoj otopini puferiranoj fosfatnim puferom (PBS).

Za pozitivnu kontrolu koristite alikvote ekstrakta uzorka koji je u ranijem testiranju pokazao pozitivan rezultat, pomiješane s 10^3 do 10^4 stanica/ml bakterije *R. solanacearum* biovar 2 (npr. soj NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; vidjeti Dodatak 2. A i B). Za usporedbu rezultata na obje ploče koristite standardnu suspenziju od 10^5 do 10^6 stanica/ml bakterije *R. solanacearum* u PBS-s. Pobrinite se da pozitivne kontrole na mikrotitarskoj ploči budu dobro odvojene od uzorka(-aka) koji se pretražuju.

U Dodatku 3 A navedeni su standardizirani pozitivni i negativni kontrolni materijali koji se mogu upotrebljavati u ovom testu.

Kontrolni materijal testirajte jednako kao i uzorke.

Potvrđena su dva protokola za test ELISA.

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

1) Upotrijebite alikvote od 100 do 200 µl ekstrakta uzorka. (Zagrijavanjem četiri minute na 100 °C u vodenoj kupelji ili bloku za zagrijavanje u nekim se slučajevima mogu smanjiti nespecifični rezultati).

2) Dodajte jednaki volumen premaznog pufera dvostruke jačine (Dodatak 4.) i promiješajte na vortex miješalici.

3) Nanesite alikvote od 100 µl u svaku od najmanje dvije jažice na mikrotitarskoj ploči (npr. Nunc-Polysorp ili ekvivalentna ploča) i inkubirajte jedan sat na 37 °C ili preko noći na 4 °C.

4) Uklonite ekstrakte iz jažica. Isperite jažice tri puta otopinom PBS-Tween (Dodatak 4.), a zadnju otopinu za ispiranje ostavite u jažicama najmanje pet minuta.

5) Pripremite odgovarajuće razrjeđenje protutijela za *R. solanacearum* u blokirajućem puferu (Dodatak 4.). Za potvrđena protutijela koja su dostupna na tržištu koristite preporučena razrjeđenja (obično dvostruko jača koncentracija nego titar).

6) Dodajte 100 µl u svaku jažicu i inkubirajte jedan sat na 37 °C.

7) Uklonite otopinu protutijela iz jažica i operite jažice kao prije (4).

8) Pripremite odgovarajuće razrjeđenje konjugata alkalne fosfataze sekundarnih protutijela u blokirajućem puferu. Dodajte 100 µl u svaku jažicu i inkubirajte jedan sat na 37 °C.

9) Uklonite konjugat protutijela iz jažica i operite jažice kao prije (4).

10) U svaku jažicu dodajte 100 µl otopine supstrata alkalne fosfataze (Dodatak 4.), inkubirajte u tami na sobnoj temperaturi i očitavajte apsorbanciju pri 405 nm u redovitim razmacima tijekom 90 minuta.

(b) DASI ELISA

1) Pripremite odgovarajuće razrjeđenje poliklonskih imunoglobulina koji djeluju protiv bakterije *R. solanacearum* u premaznom puferu pH 9,6 (Dodatak 4.). Nanesite 200 µl u svaku jažicu. Inkubirajte četiri do pet sati na 37 °C ili 16 sati na 4 °C.

2) Jažice isperite tri puta otopinom PBS-Tween (Dodatak 4.).

U najmanje dvije jažice nanesite 190 µl ekstrakta uzorka. Na svakoj ploči dodajte pozitivnu i negativnu kontrolu, i to svaku u po dvije jažice. Inkubirajte 16 sati na 4 °C.

3) Jažice isperite tri puta otopinom PBS-Tween (Dodatak 4.).

4) Pripremite odgovarajuće razrjeđenje monoklonskih protutijela specifičnih za bakteriju *R. solanacearum* u PBS-u (Dodatak 4.) koji sadrži i 0,5 % goveđeg serumskog albumina (BSA) te nanesite 190 µl u svaku jažicu. Inkubirajte dva sata na 37 °C.

5) Jažice isperite tri puta otopinom PBS-Tween (Dodatak 4.).

6) Pripremite odgovarajuće razrjeđenje protumišjih imunoglobulina konjugiranih s alkalnom fosfatazom u PBS-u. Nanesite 190 µl u svaku jažicu. Inkubirajte dva sata na 37 °C.

7) Jažice isperite tri puta otopinom PBS-Tween (Dodatak 4.).

8) Pripremite otopinu supstrata alkalne fosfataze koja sadrži 1 mg p-nitrofenil fosfata na ml pufera supstrata (Dodatak 4.). Nanesite 200 µl u svaku jažicu. Inkubirajte u tami na sobnoj temperaturi i očitavajte apsorbanciju pri 40 nm u redovitim razmacima tijekom 90 minuta.

Tumačenje rezultata testova ELISA

Test ELISA je negativan ako je prosječna optička gustoća (OD) u jažicama s duplikatom uzorka < 2x OD u jažici s negativnom kontrolom ekstrakta uzorka, pod uvjetom da su sve vrijednosti OD pozitivnih kontrola iznad 1,0 (nakon 90 minuta inkubacije sa supstratom) i da su veće od dvostruke vrijednosti OD dobivene za negativne ekstrakte uzorka.

Test ELISA je pozitivan ako je prosječna optička gustoća (OD) u jažicama s duplikatom uzorka > 2x OD u jažici s negativnom kontrolom ekstrakta uzorka, pod uvjetom da su vrijednosti OD za sve jažice s negativnom kontrolom < 2x OD u jažicama s pozitivnom kontrolom.

Ako se u ELISA testu očitaju negativni rezultati u jažicama s pozitivnom kontrolom, to ukazuje da test nije pravilno obavljen ili da je došlo do inhibicije. Ako se u ELISA testu očitaju pozitivni rezultati u jažicama s negativnom kontrolom, to ukazuje da je došlo do unakrsne kontaminacije ili do nespecifičnog vezanja protutijela.

9. **Biološki test**

Napomena: Preliminarna ispitivanja pomoću ove metode trebaju omogućiti ponovljivo otkrivanje 10^3 do 10^4 jedinica koje stvaraju kolonije bakterije *R. solanacearum* po ml, a koje su dodane ekstraktima uzoraka koji su ranije testirani s negativnim rezultatom.

Najveća osjetljivost detekcije može se očekivati ako se koriste svježe pripremljeni ekstrakti uzoraka te optimalni uvjeti rasta. Međutim, ova se metoda može uspješno primjenjivati i na ekstraktima koji su bili pohranjeni pod glicerolom na temperaturi od – 68 do – 86 °C.

Sljedeći se protokol temelji na Janse (1988).

9.1. Za svaki uzorak koji ćete pretraživati uzmite 10 biljaka osjetljivog kultivara rajčice (npr. Moneymaker ili kultivar za koji je ispitni laboratorij utvrdio da ima ekvivalentnu osjetljivost) u fazi trećeg pravog lista. Za pojedinosti o uzgoju, vidjeti Dodatak 8. Moguće je upotrijebiti i patlidžane (npr. kultivar Black Beauty ili kultivar ekvivalentne osjetljivosti), ali samo biljke u fazi 2-3 lista do potpunog razvoja trećeg pravog lista. Pokazalo se da su kod patlidžana simptomi manje ozbiljni i da se sporije razvijaju. Preporučuje se, stoga, po mogućnosti koristiti sadnice rajčice.

9.2. 100 µl ekstrakta uzorka rasporedite na pretraživane biljke.

9.2.1. Inokulacija ubrizgavanjem

Inokulirajte u stabljiku neposredno iznad kotiledona pomoću injekcije s iglom za potkožno ubrizgavanje (najmanje 23G). Uzorak rasporedite na pretraživane biljke.

9.2.2. Inokulacija zarezivanjem

Držeći biljku među prstima, pipetom nanesite kapljicu (oko 5-10 µl) suspendiranog taloga na stabljiku između kotiledona i prvog lista.

Pomoću sterilnog skalpela napravite dijagonalni rez, dug oko 1,0 cm i dubok oko 2/3 debljine stabljike, počevši zarezivati od kapljice taloga.

Rez zatvorite sterilnim vazelinom pomoći brizgalice.

9.3. Koristeći istu tehniku, inokulirajte pet sadnica vodenom suspenzijom 10^5 do 10^6 stanica/ml pripremljenom iz 48-satne kulture virulentnog biovara 2 soja bakterije *R. solanacearum* za pozitivnu kontrolu, a puferom za talog za negativnu kontrolu (Dodatak 4.). Da ne bi došlo do unakrsne kontaminacije, odvojite biljke za pozitivnu i negativnu kontrolu od ostalih biljaka.

9.4. Pretraživane biljke uzgajajte u karanteni do četiri tjedna na temperaturi od 25 do 30 °C i uz visoku relativnu vlažnost te ih primjereno zalijevajte pazeći da ne dođe do zasićenja vodom ili venuća zbog nedostatka vode. Kako ne bi došlo do kontaminacije, biljke za pozitivnu i negativnu kontrolu inkubirajte na jasno odvojenim policama u stakleniku ili komori za uzgoj ili, ako je prostor ograničen, osigurajte da pojedini postupci budu jasno odvojeni. Ako se biljke za različite uzorke moraju inkubirati jedne blizu drugih, odvojite ih prikladnim zaslonima. Pri gnojenju, zalijevanju, pregledavanju i svakom drugom postupku s biljkama dobro pazite da ne dođe do unakrsne kontaminacije. Od ključne je važnosti da u staklenicima i komorama za uzgoj ne bude nikakvih insekata jer oni mogu prenijeti bakteriju s uzorka na uzorak.

Pratite javljaju li se simptomi venuća, epinastije, kloroze i/ili zaostajanja u rastu.

9.5. Iz inficiranih biljaka izolirajte (odjeljak II.3) i identificirajte pročišćene kulture pretpostavljene bakterije *R. solanacearum* (odjeljak VI.B).

9.6. Ako se nakon tri tjedna ne uoče nikakvi simptomi, obavite test IF/PCR/izdvajanja na kompozitnom uzorku dijelova stabljike dugih 1 cm i uzetih iznad točke inokulacije na svakoj pretraživanoj biljci. Ako test bude pozitivan, primijenite metodu nasađivanja razrjeđenja (odjeljak 4.1.)

9.7. Identificirajte sve pročišćene kulture pretpostavljene bakterije *R. solanacearum* (odjeljak VI.B).

Tumačenje rezultata biološkog testa

Rezultati biološkog testa smatraju se valjanim ako biljke pozitivne kontrole pokazuju tipične simptome, ako se iz tih biljaka može ponovno izdvojiti bakterija, i ako se na negativnim kontrolama ne pronađu nikakvi simptomi.

Biološki test je negativan ako pretraživane biljke nisu zaražene bakterijom *R. solanacearum*, pod uvjetom da je bakterija *R. solanacearum* otkrivena u pozitivnim kontrolama.

Biološki test je pozitivan ako su pretraživane biljke zaražene bakterijom *R. solanacearum*.

B. *IDENTIFIKACIJSKI TESTOVI*

Identificirajte čiste kulture pretpostavljenih izolata bakterije *R. solanacearum* pomoću najmanje dva sljedeća testa koja se temelje na različitim biološkim načelima.

Prema potrebi, u svaki korišteni test uključite poznate referentne sojeve (vidjeti Dodatak 3.).

1. **Identifikacijski testovi pomoću hranjive podloge i enzimski testovi**

Odredite sljedeće fenotipske osobine koje su sustavno prisutne ili odsutne kod bakterije *R. solanacearum*, prema metodama Lelliott i Stead (1987), Klement *et al.* (1990), Schaad (2001).

Test	Očekivani rezultat
Stvaranje fluorescentnog pigmenta	–
Inkluzije poli-β-hidroksibutirata	+
Oksidacijski/fermentacijski (O/F) test	O+/F–
Aktivnost katalaze	+
Test oksidaze po Kovacu	+
Redukcija nitrata	+
Iskorištavanje citrata	+
Rast na 40 °C	–
Rast u 1 % NaCl	+
Rast u 2 % NaCl	–
Aktivnost arginin-dihidrolaze	–
Likvefakcija želatine	–
Hidroliza škroba	–
Hidroliza eskulina	–
Stvaranje levana	–

2. **Test IF**

2.1. Pripremite suspenziju od oko 10^6 stanica/ml u puferu za test IF (Dodatak 4.).

2.2. Pripremite niz dvostrukih razrjeđenja odgovarajućeg antiseruma (vidjeti internetsku stranicu http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

2.3. Primijenite test IF (odjeljak VI.A.5).

2.4. Test IF je pozitivan ako je IF-titar kulture jednak titru pozitivne kontrole.

3. **Test ELISA**

Napomena: Ako primjenjujete samo 2 identifikacijska testa, ne primjenjujte drugi serološki test pored ove metode.

3.1. Pripremite suspenziju od oko 10^8 stanica/ml u 1 X PBS (Dodatak 4.).

3.2. Izvedite odgovarajući postupak ELISA s monoklonskim protutijelom specifičnim za bakteriju *R. solanacearum*.

3.3. Test ELISA je pozitivan ako je ELISA-vrijednost kulture jednaka najmanje polovici vrijednosti pozitivne kontrole.

4. **Testovi PCR**

4.1. Pripremite suspenziju od oko 10^6 stanica/ml u sterilnoj vodi namijenjenoj uporabi u molekularnoj biologiji.

4.2. Zagrijte 100 µl stanične suspenzije u zatvorenim epruvetama u bloku za zagrijavanje ili vreloj vodenoj kupelji četiri minute na 100 °C. Uzorci se mogu potom, do njihove uporabe, pohraniti na – 16 do – 24 °C.

4.3. Primijenite odgovarajuće postupke PCR kako biste umnožili fragmente specifične za *R. solanacearum* [npr. Seal *et al.* (1993); Pastrik i Maiss (2000); Pastrik *et al.* (2002); Boudazin *et al.* (1999); Opina *et al.* (1997), Weller *et al.* (1999)].

4.4. Smatra se da je *R. solanacearum* pozitivno identificirana ako su umnoženi produkti PCR-a iste veličine i imaju iste polimorfizme duljine restrikcijskih fragmenata kao i soj pozitivne kontrole.

5. **Test FISH**

5.1. Pripremite suspenziju od oko 10^6 stanica/ml u ultra čistoj vodi.

5.2. Primijenite postupak FISH (odjeljak VI.A.7.) s najmanje dvije oligo-sonde specifične za *R. solanacearum* (Dodatak 7.).

5.3. Test FISH je pozitivan ako se i kod kulture i kod pozitivne kontrole dobiju iste reakcije.

6. **Profiliranje masnih kiselina (FAP)**

6.1. Uzgajajte kulturu 48 sati na 28 °C na triptikaza-soja-agaru (Oxoid).

6.2. Primijenite odgovarajući postupak FAP (Janse, 1991; Stead, 1992).

6.3. Test FAP je pozitivan ako je profil pretpostavljene kulture identičan profilu pozitivne kontrole. Prisutnost karakterističnih masnih kiselina 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH i 18:1 2OH te odsutnost 16:0 3OH u velikoj mjeri ukazuje na *Ralstonia* sp.

7. **Metode karakterizacije soja**

Kod svakog novog slučaja izdvajanja *R. solanacearum* preporučuje se obaviti karakterizaciju soja jednom od sljedećih metoda.

Prema potrebi, u svaki korišteni test uključite poznate referentne sojeve (vidjeti Dodatak 3.).

7.1. Određivanje biovara

R. solanacearum se dijeli na biovare na temelju sposobnosti iskorištavanja i/ili oksidiranja tri disaharida i tri heksozna alkohola (Hayward, 1964 i Hayward *et al.*, 1990). Hranjive podloge za ispitivanje biovara opisane su u Dodatku 2. Test se može uspješno obaviti inokuliranjem podloge čistim kulturama izolata *R. solanacearum* te inkubiranjem na 28 °C. Ako se podloga rasporedi u 96 sterilnih jažica na ploči za uzgoj stanica (200 µl po jažici), u roku od 72 sata može se uočiti promjena boje od maslinasto zelene na žutu, što znači da je rezultat testa pozitivan.

	Biovar				
	1	2	3	4	5
Iskorištavanje:					
Maltoza	–	+	+	–	+
Laktoza	–	+	+	–	+
D (+) celobioza	–	+	+	–	+
Manitol	–	–	+	+	+
Sorbitol	–	–	+	+	–
Dulcitol	–	–	+	+	–

Biovar 2 se dijeli na podfenotipove pomoću dodatnih testova.

	Biovar 2A (raširen u cijelom svijetu)	Biovar 2A (u Čileu i Kolumbiji)	Biovar 2T (u tropskim područjima)
Iskorištavanje trehaloze	–	+	+
Iskorištavanje mezo-inozitola	+	–	+
Iskorištavanje D-riboze	–	–	+
Pektolitička aktivnost ([1])	slaba	slaba	visoka

([1]) Vidjeti Lelliott i Stead (1987)

7.2. Genomski otisak

Molekularna diferencijacija sojeva u kompleksu *R. solanacearum* može se postići primjenom nekoliko tehnika, uključujući sljedeće:

7.2.1. Analiza polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata (RFLP) (Cook *et al.*, 1989).

7.2.2. PCR ponavljajućih sljedova, korištenjem početnica REP, BOX i ERIC (Louws *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995).

7.2.3. Analiza polimorfizma duljine umnoženih fragmenata (AFLP) (Van der Wolf *et al.*, 1998).

7.3. Metode PCR

Specifične PCR početnice (Pastrik *et al.*, 2002; vidjeti Dodatak 6.) mogu se upotrijebiti za razlikovanje sojeva koji pripadaju skupini 1 (biovari 3, 4 i 5) i skupini 2 (biovari 1, 2A i 2T) bakterije *R. solanacearum*, kako je prvobitno bilo utvrđeno analizom RFLP (Cook *et al.*, 1989) i sekvenciranjem 16S rDNK (Taghavi *et al.*, 1996).

C. *POTVRDNI TEST*

Test patogenosti mora se obaviti kao konačna potvrda dijagnoze *R. solanacearum* i da bi se ocijenila virulentnosti kultura identificiranih kao *R. solanacearum*.

1) Pripremite inokulum od oko 10^6 stanica/ml iz 24 do 48 sati stare kulture izolata koji namjeravate testirati te odgovarajući pozitivni kontrolni soj bakterije *R. solanacearum* (npr. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; vidjeti Dodatak 3.).

2) Inokulirajte 5 do 10 sadnica osjetljivih rajčica ili patlidžana u fazi trećeg pravog lista (vidjeti odjeljak VI.A.9).

3) Inkubirajte do dva tjedna na 25 do 28 °C i uz visoku relativnu vlažnost te ih primjereno zalijevajte pazeći da ne dođe do zasićenja vodom ili venuća zbog nedostatka vode. Kod čistih bi se kultura trebalo pojaviti tipično venuće u roku od 14 dana. Ako nakon ovog razdoblja simptomi nisu prisutni, ne može se potvrditi da je kultura patogeni oblik bakterije *R. solanacearum*.

4) Pratite javljaju li se simptomi venuća i/ili epinastije, kloroze i zaostajanja u rastu.

5) Iz simptomatskih biljaka izdvojite dio stabljike oko 2 cm iznad točke inokulacije. Smrvite u prah i suspendirajte u manjem volumenu sterilne destilirane vode ili u 50 mM fosfatnog pufera (Dodatak 4.). Izdvajanje iz suspenzije izvedite tako što ćete razrjeđenje razmazati ili razvući u pruge na prikladnu hranjivu podlogu, po mogućnosti selektivnu (Dodatak 2.), inkubirajte 48 do 72 sata na 28 °C te pratite stvaranje kolonija tipičnih za *R. solanacearum*.

Dodatak 1.

Laboratoriji uključeni u optimizaciju i validaciju protokola

Laboratorij [1]	Mjesto	Država
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Beč i Linz	Austrija
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Belgija
Plantedirektoratet	Lyngby	Danska
Central Science Laboratory	York	Engleska
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburgh	Škotska
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	Francuska
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Francuska
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Njemačka
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Njemačka
State Laboratory	Dublin	Irska
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali	Bologna	Italija
Regione Veneto Unità Periferica per i Servizi Fitosanitari	Verona	Italija
Nederlandse Algemene Keuringsdienst	Emmeloord	Nizozemska
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Nizozemska
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lisabon	Portugal
Centro Diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	Španjolska
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias	Valencia	Španjolska
Swedish University of Agricultural Sciences	Uppsala	Švedska

[1] Znanstvenici za kontakt: vidjeti internetsku stranicu http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

Dodatak 2.

Podloge za izdvajanje i uzgoj bakterije *R. solanacearum*

(a) **Uobičajene hranjive podloge**

Hranjivi agar (NA)

Hranjivi agar (Difco)	23,0 g
Destilirana voda	1,0 l

Rastopite sastojke i sterilizirajte u autoklavu na 121 °C 15 minuta.

Agar s kvascem, peptonom i glukozom (YPGA)

Ekstrakt kvasca (Difco)	5,0 g
Bacto pepton (Difco)	5,0 g
D (+) glukoza (monohidrat)	10,0 g
Bacto agar (Difco)	15,0 g
Destilirana voda	1,0 l

Rastopite sastojke i sterilizirajte u autoklavu na 121 °C 15 minuta.

Agar od saharoze i peptona (SPA)

Saharoza	20,0 g
Bacto pepton (Difco)	5,0 g
K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,25 g
Bacto agar (Difco)	15,0 g
Destilirana voda	1,0 l
pH 7,2 – 7,4	

Rastopite sastojke i sterilizirajte u autoklavu na 121 °C 15 minuta.

Kelmanova tetrazol-podloga

Casamino kiseline (Difco)	1,0 g
Bacto pepton (Difco)	10,0 g
Dekstroza	5,0 g
Bacto agar (Difco)	15,0 g
Destilirana voda	1,0 l

Rastopite sastojke i sterilizirajte u autoklavu na 121 °C 15 minuta.

Ohladite na 50 °C i dodajte otopinu 2,3,5-trifenil-tetrazol-klorida (Sigma), steriliziranu filtriranjem, kako biste dobili konačnu koncentraciju od 50 mg/l.

(b) **Validirane selektivne hranjive podloge**

Podloga SMSA (Englebrecht, 1994, izmijenjena od Elphinstone *et al.,* 1996)

Osnovna podloga	
Casamino kiseline (Difco)	1,0 g
Bacto pepton (Difco)	10,0 g
Glicerol	5,0 g
Bacto agar (Difco); vidjeti *napomenu 2*	15,0 g
Destilirana voda	1,0 l

Rastopite sastojke i sterilizirajte u autoklavu na 121 °C 15 minuta.

Ohladite na 50 °C i dodajte osnovne vodene otopine sljedećih sastojaka, sterilizirane filtriranjem, kako biste dobili predviđene konačne koncentracije:

Kristal ljubičasto (Sigma)	5 mg na l
Polimiksin-B-sulfat (Sigma P-1004)	600 000 U (oko 100 mg) na l
Bacitracin (Sigma B-0125)	1 250 U (oko 25 mg) na l
Kloramfenikol (Sigma C-3175)	5 mg na l
Penicilin-G (Sigma P-3032)	825 U (oko 0,5 mg) na l
2,3,5-trifenil-tetrazol-klorid (Sigma)	50 mg na l

Napomena:

1. Reagensi drugačiji od gore navedenih mogu utjecati na rast bakterije *R. solanacearum*.
2. Umjesto Bacto agara (Difco) može se koristiti Oxoid agar br. 1. U tom će slučaju *R. solanacearum* sporije rasti, ali se može smanjiti i rast konkurentnih saprofita. Za formiranje tipičnih kolonija bakterije *R. solanacearum* možda će trebati 1 do 2 dana više, a crveno obojenje može biti svjetlije i difuznije nego na Bacto agaru.
3. Povećanjem koncentracije bacitracina na 2 500 U/l mogu se smanjiti populacije konkurentnih bakterija, a da se ne utječe na rast bakterije *R. solanacearum*.

Pohranite hranjivu podlogu i osnovnu otopinu antibiotika na 4 °C na tamno mjesto i upotrijebite u roku od jednog mjeseca.

Prije uporabe, s ploča moramo ukloniti površinsku kondenzaciju.

Ploče ne smijete pretjerano osušiti.

Nakon pripremanja svake nove serije hranjive podloge, treba obaviti kontrolu kakvoće tako što se nasadi suspenzija referentne kulture *R. solanacearum* (vidjeti Dodatak 3.) i prati hoće li doći do stvaranja tipičnih kolonija nakon dva do pet dana inkubacije na 28 °C.

(c) **Validirane obogaćene podloge**

Bujon SMSA (Elphinstone *et al.*, 1996)

Pripremite kao za selektivnu podlogu SMSA s agarom, ali izostavite Bacto agar i 2,3,5-trifenil-tetrazol-klorid.

Modificirani bujon Wilbrink (Caruso *et al.*, 2002)

Saharoza	10 g
Proteoza-pepton	5 g
K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4$	0,25 g
$NaNO_3$	0,25 g
Destilirana voda	1 l

Sterilizirajte u autoklavu na 121 °C 15 minuta te ohladite na 50 °C.

Dodajte osnovne otopine antibiotika kao za bujon SMSA.

Dodatak 3.

A. **Standardizirani kontrolni materijali dostupni na tržištu**

(a) *Bakterijski izolati*

Preporučuje se koristiti sljedeće bakterijske izolate kao standardni referentni materijal bilo za pozitivne kontrole (Tablica 1) ili tijekom optimizacije testova u svrhu izbjegavanja unakrsnih reakcija (Tablica 2). Svi su sojevi dostupni na tržištu i mogu se nabaviti kod:

1. National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPPB), Central Science Laboratory, York, Ujedinjena Kraljevina

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

3. Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP), INRA – Station de Phytobactériologie, Angers, Francuska

Tablica 1. Referentni popis SMT izolata bakterije *R. solanacearum*

Oznaka NCPPB	Br. SMT	Ostale oznake	Država podrijetla	Biovar
NCPPB 4153	6	CFBP 4582, Pr 3020, EURS11	Egipat	2
NCPPB 4154	10	CFBP 4585, 550, EURS21	Turska	2
NCPPB 3857	12	CFBP 4587, Pr 1140, EURS26	Engleska	2
NCPPB 1584	23	CFBP 4598, EURS49	Cipar	2
NCPPB 2505	24	CFBP 4599, EURS50	Švedska	2
NCPPB 4155	26	CFBP 4601, 502, EURS55	Belgija	2
NCPPB 4156 (*)	71 (*)	PD 2762, CFBP 3857	Nizozemska	2
NCPPB 4157	66	LNPV 15.59	Francuska	2
NCPPB 4158	39	CFBP 4608, Port 448, EURS80	Portugal	2
NCPPB 4160	69	IVIA–1632-2	Španjolska	2
NCPPB 4161	76	B3B	Njemačka	2
NCPPB 325	41	CFBP 2047, KEL60-1, R842	SAD	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	Brazil	2T
NCPPB 3996	46	CFBP 3928, R276/355, CIP72, SEQ225	Peru	3
NCPPB 3997	47	CFBP 4614, R280/363, CIP49, HAY0131a	Australija	3
NCPPB 4029	48	CFBP 4615, R297/349, CIP121, CMIb2861	Sri Lanka	4
NCPPB 4005	49	CFBP 4616, R470	Filipini	4
NCPPB 4011	50	CFBP 4617, R288, HEmps2	Kina	5

(*) Upotrebljavati kao standardni referentni soj bakterije *R. solanacearum* biovar 2 (rasa 3).

Napomena: Autentičnost gore navedenih sojeva može se jamčiti samo ako su oni dobiveni iz autentične zbirke kultura.

Tablica 2. Referentni popis SMT serološki ili genetski srodnih bakterija za uporabu pri optimizaciji testova otkrivanja

Oznaka NCPPB	Br. SMT	Ostale oznake	Identifikacija
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. (2)
NCPPB 4173	—	PD 2318	*Aureobacterium* sp. (1)
NCPPB 4174	81	IVIA 1844.06	*Flavobacterium* sp. (1) (2)

(1) Soj koji u seroloških testovima (IF i/ili ELISA) može unakrsno reagirati s poliklonskim antiserumima.
(2) Soj od kojega se u nekim laboratorijima može umnožiti produkt PCR veličine slične veličini koja se očekuje pri uporabi posebnih početnica OLI-1 i Y-2 (vidjeti Dodatak 6.).
(3) U većini testova mogao bi unakrsno reagirati, ali je poznato da se javlja samo na bananama u Indoneziji.

(b) *Standardizirani kontrolni materijali dostupni na tržištu*

Dolje navedeni standardni kontrolni materijal može se dobiti iz zbirke kultura NCPPB.

Liofilizirane granule krumpirovog ekstrakta iz 200 zdravih krumpirovih gomolja kao negativna kontrola za sve testove.

Liofilizirane granule krumpirovog ekstrakta iz 200 zdravih krumpirovih gomolja s 10^3 do 10^4 i 10^4 do 10^6 stanica *R. solanacearum* biovar 2 (soj NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) kao pozitivna kontrola za serološke testove i testove PCR. S obzirom da liofilizacija utječe na vijabilnost stanica, one nisu prikladne kao standardna kontrola za testove izdvajanja ili biološke testove.

Formalinom fiksirane suspenzije bakterije *R. solanacearum* biovar 2 (soj NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) s 10^6 stanica/ml kao pozitivna kontrola za serološke testove.

B. **Pripremanje pozitivnih i negativnih kontrola za glavne testove probira (PCR/IF i FISH)**

Uzgojite 48-satnu kulturu virulentnog soja *R. solanacearum* rasa 3/biovar 2 (npr. soj NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) na osnovnoj podlozi SMSA i suspendirajte u 10 mM fosfatnom puferu da dobijete gustoću stanica od oko 2×10^8 cfu/ml. Ovo se obično postiže blago zamućenom suspenzijom optičke gustoće 0,15 na 600 nm.

Uklonite jezgre krajeva stolona na 200 gomolja krumpira uzetih od vrste s bijelom korom za koju je poznato da je nije napala bakterija *R. solanacearum*.

Obradite krajeve stolona uobičajenom metodom i resuspendirajte talog u 10 ml.

Napunite 10 sterilnih mikroepruveta od 1,5 ml s 900 µl resuspendiranog taloga.

U prvu mikroepruvetu ulijte 100 µl suspenzije *R. solanacearum*. Izmiješajte na vortex miješalici.

Odredite decimalne razine kontaminacije putem daljnjih razrjeđenja u sljedećih pet mikroepruveta.

Ovih šest kontaminiranih mikroepruveta služit će za pozitivnu kontrolu. Četiri nekontaminirane mikroepruvete služit će za negativnu kontrolu. U skladu s tim, označite mikroepruvete.

Pripremite alikvote od 100 µl u mikroepruvetama od 1,5 ml tako da dobijete devet kopija svakog kontrolnog uzorka. Do uporabe ih pohranite na – 16 do – 24 °C.

Prisutnost i količinu *R. solanacearum* u kontrolnim uzorcima potvrdite najprije testom IF.

Za test PCR, obavite ekstrakciju DNK na pozitivnim i negativnim kontrolnim uzorcima za svaku seriju pretraživanih uzoraka.

Za testove IF i FISH, obavite testove na pozitivnim i negativnim kontrolnim uzorcima za svaku seriju pretraživanih uzoraka.

Kod testova IF, FISH i PCR, *R. solanacearum* se mora otkriti u najmanje 10^6 i 10^4 stanica/ml pozitivnih kontrola i ni u jednoj negativnoj kontroli.

Dodatak 4.

Puferi za postupke ispitivanja

Općenito: Neotvoreni sterilni puferi mogu se pohraniti do godinu dana.

1. **Puferi za postupak ekstrakcije**

1.1. Ekstrakcijski pufer (50 mM fosfatnog pufera, pH 7,0)

Ovaj se pufer koristi za ekstrakciju bakterije iz biljnog tkiva homogenizacijom ili tresenjem.

Na_2HPO_4 (anhidrid)	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
Destilirana voda	1,00 l

Rastopite sastojke, provjerite pH i sterilizirajte u autoklavu 15 minuta na 121 °C.

Mogu biti korisni i sljedeći dodatni sastojci:

	Svrha	*Količina (na l)*
Pahuljice Lubrol	deflokulant (*)	0,5 g
DC silikon protiv pjenjenja	sredstvo protiv pjenjenja (*)	1,0 ml
Tetranatrijev pirofosfat	antoksidant	1,0 g
Polivinilpirolidon-40000 (PVP-40)	vezivanje inhibitora PCR-a	50 g

(*) Upotrebljavati s metodom ekstrakcije pomoću homogeniziranja

1.2. Pufer za talog (10 mM fosfatnog pufera, pH 7,2)

Ovaj se pufer koristi za resuspendiranje i razrjeđivanje ekstrakta krajeva stolona krumpirovih gomolja nakon što su centrifugiranjem koncentrirani u talog.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,4 g
Destilirana voda	1,0 l

Rastopite sastojke, provjerite pH i sterilizirajte u autoklavu 15 minuta na 121 °C.

2. **Puferi za test IF**

2.1. IF-pufer (10 mM fiziološke otopine puferirane fosfatnim puferom (PBS), pH 7,2)

Ovaj se pufer koristi za razrjeđivanje protutijela

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

Rastopite sastojke, provjerite pH i sterilizirajte u autoklavu 15 minuta na 121 °C.

2.2. IF-pufer Tween

Ovaj se pufer koristi za pranje stakalaca.

IF-puferu dodajte 0,1 % Tween 20.

2.3. Glicerol s fosfatnim puferom, pH 7,6

Ovaj se pufer koristi kao tekućina za prekrivanje stakalca u testu IF kako bi se pojačala fluorescencija.

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

Pokrivne otopine protiv blijeđenja dostupne su na tržištu, npr. Vectashield® (Vector Laboratories) ili Citifluor® (Leica).

3. **Puferi za neizravni test ELISA**

3.1. Premazni pufer dvostruke jačine, pH 9,6

Na_2CO_3	6,36 g
$NaHCO_3$	11,72 g
Destilirana voda	1,00 l

Rastopite sastojke, provjerite pH i sterilizirajte u autoklavu 15 minuta na 121 °C.

Može se dodati natrijev sulfit (0,2 %) kao antioksidant ako je potrebno spriječiti stvaranje oksidiranih aromatskih spojeva.

3.2. 10X fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (PBS), pH 7,4

NaCl	80,0 g
KH_2PO_4	2,0 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	29,0 g
KCl	2,0 g
Destilirana voda	1,0 l

3.3. PBS-Tween

10X PBS	100 ml
10 % Tween 20	5 ml
Destilirana voda	895 ml

3.4. Blokirajući pufer (protutijela) (mora biti svježe pripremljen)

10X PBS	10,0 ml
Polivinilpirolidon-44000 (PVP-44)	2,0 g
10 % Tween 20	0,5 ml
Mlijeko u prahu	0,5 g
Destilirana voda	dopunite do 100 ml

3.5. Otopina supstrata alkalne fosfataze, pH 9,8

Dietanolamin	97 ml
Destilirana voda	800 ml

Pomiješajte i pomoću koncentriranog HCl postignite pH 9,8.

Dopunite destiliranom vodom do jednog litra.

Dodajte 0,2 g $MgCl_2$.

Rastopite dvije 5-miligramske tablete fosfataznog supstrata (Sigma) na 15 ml otopine.

4. **Puferi za test DASI ELISA**

4.1. Premazni pufer, pH 9,6

Na_2CO_3	1,59 g
$NaHCO_3$	2,93 g
Destilirana voda	1 000 ml

Rastopite sastojke i provjerite pH.

4.2. 10X fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (PBS), pH 7,4

NaCl	80,0 g
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	4,0 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	27,0 g
Destilirana voda	1 000 ml

4.3. PBS-Tween

10X PBS	50 ml
10 % Tween 20	5 ml
Destilirana voda	950 ml

4.4. Pufer supstrata, pH 9,8

Dietanolamin	100 ml
Destilirana voda	900 ml

Pomiješajte i pomoću koncentriranog HCl postignite pH 9,8.

Dodatak 5.

Određivanje stupnja kontaminacije u testovima IF i FISH

1. Odredite srednji broj tipičnih fluorescentnih stanica po vidnom polju (c).

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

   $C = c \times S/s$

   gdje je S = površina jažice stakalca s više jažica

   i s = površina polja objektiva

   $s = \pi i^2/4G^2K^2$ gdje je i = koeficijent polja (ovisi o vrsti okulara i iznosi od 8 do 24

   K = koeficijent tubusa (1 ili 1,25)

   G = povećanje objektiva (100 ×, 40 × itd.)

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

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

   gdje je y = količina resuspendiranog taloga u svakoj jažici

   i F = faktor razrjeđenja resuspendiranog taloga

Dodatak 6.

Validirani protokoli i reagensi za PCR

NB: Preliminarna ispitivanja trebaju omogućiti ponovljivo otkrivanje 10^3 do 10^4 stanica bakterije *R. solanacearum* po ml ekstrakta uzorka.

Preliminarna ispitivanja ne smiju pokazati lažno pozitivne rezultate kod određenih odabranih bakterijskih sojeva (vidjeti Dodatak 3.).

1. **Protokol za PCR prema Seal *et al.* (1993)**

1.1. Oligonukleotidne početnice

Početnica Forward OLI-1 5′-GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC-3′

Početnica Reverse Y-2 5′-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3′

Očekivana veličina produkta umnažanja iz kalupa DNK bakterije *R. solanacearum* = 288 bp.

1.2. Reakcijska smjesa za PCR

Reagens	Količina po reakciji	Konačna koncentracija
Sterilna ultra čista voda	17,65 µl	
10X PCR pufer [1] (15 mM $MgCl_2$)	2,5 µl	1X (1,5 mM $MgCl_2$)
dNTP smjesa (20 mM)	0,25 µl	0,2 mM
Početnica OLI-1 (20 µM)	1,25 µl	1µM
Početnica Y-2 (20 µM)	1,25 µl	1µM
Taq polimeraza (5U/µl) [1]	0,1 µl	0,5 U
Volumen uzorka	2,0 µl	
Ukupni volumen	25 µl	

[1] Metoda je bila validirana *Taq* polimerazom Perkin Elmer (AmpliTaq) i Gibco BRL

1.3. Uvjeti za reakciju PCR

Provedite sljedeći program:

1 ciklus od:	i.	2 minute na 96 °C (denaturacija kalupa DNK)
35 ciklusa od:	ii.	20 sekundi na 94 °C (denaturacija kalupa DNK)
	iii.	20 sekundi na 68 °C (prianjanje)
	iv.	30 sekundi na 72 °C (produljenje kopije)
1 ciklus od:	v.	10 minuta na 72 °C (konačno produljenje)
	vi.	držati na 4 °C

NB: Ovaj je program optimiziran za korištenje s uređajem za PCR (thermal cycler) Perkin Elmer 9600. Za rad s drugim modelima uređaja možda će trebati prilagoditi trajanje ciklusa ii., iii. i iv.

1.4. Analiza produkta umnažanja pomoću restrikcijskog enzima

Produkti PCR-a umnoženi iz DNK bakterije *R. solanacearum* proizvode karakteristični polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata s enzimom Ava II nakon inkubacije na 37 °C.

2. **Protokol za PCR prema Pastrik i Maiss (2000)**

2.1. Oligonukleotidne početnice

Početnica Forward Ps-1 5′- agt cga acg gca gcg ggg g -3′

Početnica Reverse Ps-2 5′- ggg gat ttc aca tcg gtc ttg ca -3′

Očekivana veličina produkta umnažanja iz kalupa DNK bakterije *R. solanacearum* = 553 bp.

2.2. Reakcijska smjesa za PCR

Reagens	Količina po reakciji	Konačna koncentracija
Sterilna ultra čista voda	16,025 µl	
10X PCR pufer ([1])	2,5 µl	1X (1,5 mM $MgCl_2$)
BSA (frakcija V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
d-nTP smjesa (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Početnica Ps-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Početnica Ps-2 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Taq polimeraza (5U/µl) ([1])	0,1 µl	0,5 U
Volumen uzorka	5,0 µl	
Ukupni volumen	25,0 µl	

([1]) Metoda je bila validirana *Taq* polimerazom Perkin Elmer (AmpliTaq) i Gibco BRL
NB: Prvotno optimizirano za uređaj (thermo cycler) MJ Research PTC 200 s Gibco Taq polimerazom. Pri istim koncentracijama može se koristiti i Perkin Elmer AmpliTaq i pufer

2.3. Uvjeti za reakciju PCR

Provedite sljedeći program:

1 ciklus od:	i.	5 minuta na 95 °C (denaturacija kalupa DNK)
35 ciklusa od:	ii.	30 sekundi na 95 °C (denaturacija kalupa DNK)
	iii.	30 sekundi na 68 °C (prianjanje početnica)
	iv.	45 sekundi na 72 °C (produljenje kopije)
1 ciklus od:	v.	5 minuta na 72 °C (konačno produljenje)
	vi.	držati na 4 °C

NB: Ovaj je program optimiziran za korištenje s uređajem za PCR (thermal cycler) MJ Research PTC 200. Za rad s drugim modelima uređaja možda će trebati prilagoditi trajanje ciklusa ii., iii. i iv.

2.4. Analiza produkta umnažanja pomoću restrikcijskog enzima

Produkti PCR-a umnoženi iz DNK bakterije *R. solanacearum* proizvode karakteristični polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata s enzimom *Taq I* nakon inkubacije od 30 minuta na 65 °C. Restrikcijski fragmenti dobiveni iz fragmenta specifičnog za *R. solanacearum* veliki su 457 bp i 96 bp.

3. **Protokol za multipleks PCR s unutarnjom PCR kontrolom (Pastrik *et al.*, 2002)**

3.1. Oligonukleotidne početnice

Početnica Forward RS-1-F 5′-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3′

Početnica Reverse RS-1-R 5′-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3′

Početnica Forward NS-5-F 5′-AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G-3′

Početnica Reverse NS-6-R 5′-GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC-3′

Očekivana veličina produkta umnažanja iz kalupa DNK bakterije *R. solanacearum* = 718 bp (skup početnica RS).

Očekivana veličina produkta umnažanja iz unutarnje PCR kontrole 18S rRNA = 310 bp (skup početnica NS).

3.2. Reakcijska smjesa za PCR

Reagens	Količina po reakciji	Konačna koncentracija
Sterilna ultra čista voda	12,625 µl	
10X PCR pufer (1) (15 mM $MgCl_2$)	2,5 µl	1X (1,5 mM $MgCl_2$)
BSA (frakcija V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
d-nTP smjesa (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Početnica RS-1-F (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Početnica RS-1-R (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Početnica NS-5-F (10 µM) (2)	0,15 µl	0,06 µM
Početnica NS-6-R (10 µM) (2)	0,15 µl	0,06 µM
Taq polimeraza (5U/µl) (1)	0,2 µl	1,0 U
Volumen uzorka	5,0 µl	
Ukupni volumen	25,0 µl	

(1) Metoda je bila validirana *Taq* polimerazom Perkin Elmer (AmpliTaq) i Gibco BRL
(2) Koncentracije početnica NS-5-F i NS-6-R bile su optimizirane za ekstrakciju jezgra stolona metodom homogenizacije i pročišćavanjem DNK prema Pastriku (2000) (vidjeti odjeljak VI.A.6.1.a). Ako se ekstrakcija obavlja tresenjem ili ako se primjenjuju druge metode izdvajanja DNK, trebat će ponovno optimizirati koncentracije reagensa.

3.3. Uvjeti za reakciju PCR

Provedite sljedeći program:

1 ciklus od:	i.	5 minuta na 95 °C (denaturacija kalupa DNK)
35 ciklusa od:	ii.	30 sekundi na 95 °C (denaturacija kalupa DNK)
	iii.	30 sekundi na 58 °C (prianjanje početnica)
	iv.	45 sekundi na 72 °C (produljenje kopije)
1 ciklus od:	v.	5 minuta na 72 °C (konačno produljenje)
	vi.	držati na 4 °C

NB: Ovaj je program optimiziran za korištenje s uređajem za PCR (thermal cycler) MJ Research PTC 200. Za rad s drugim modelima uređaja možda će trebati prilagoditi trajanje ciklusa ii., iii. i iv.

3.4. Analiza produkta umnažanja pomoću restrikcijskog enzima

Produkti PCR-a umnoženi iz DNK bakterije *R. solanacearum* proizvode karakteristični polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata s enzimom *Bsm* I ili izoshizomerom (npr. Mva 1269 I) nakon inkubacije od 30 minuta na 65 °C.

4. **Protokol za PCR specifičan za biovar *R. solanacearum* (Pastrik *et al.*, 2001)**

4.1. Oligonukleotidne početnice

Početnica Forward Rs-1-F 5′-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3′

Početnica Reverse Rs-1-R 5′-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3′

Početnica Reverse Rs-3-R 5′-TTC ACG GCA AGA TCG CTC-3′

Očekivana veličina produkta umnažanja iz kalupa DNK bakterije *R. solanacearum*:

s Rs-1-F/Rs-1-R = 718 bp

s Rs-1-F/Rs-3-R = 716 bp

4.2. Reakcijska smjesa za PCR

(a) Specifični PCR za biovar 1/2

Reagens	Količina po reakciji	Konačna koncentracija
Sterilna ultra čista voda	12,925 µl	
10X PCR pufer ([1])	2,5 µl	1X (1,5 mM $MgCl_2$)
BSA (frakcija V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
d-NTP smjesa (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Početnica Rs-1-F (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Početnica Rs-1-R (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Taq polimeraza (5U/µl) ([1])	0,2 µl	1,0 U
Volumen uzorka	5,0 µl	
Ukupni volumen	25,0 µl	

([1]) Metode su validirane *Taq* polimerazom Perkin Elmer (AmpliTaq) i Gibco BRL

(b) Specifični PCR za biovar 3/4/5

Reagens	Količina po reakciji	Konačna koncentracija
Sterilna ultra čista voda	14,925µl	
10X PCR pufer ([1])	2,5 µl	1X (1,5 mM $MgCl_2$)
BSA (frakcija V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
dNTP smjesa (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Početnica Rs-1-F (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Početnica Rs-1-R (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Taq polimeraza (5U/µl) ([1])	0,2 µl	1,0 U
Volumen uzorka	5,0 µl	
Ukupni volumen	25,0 µl	

([1]) Metode su validirane *Taq* polimerazom Perkin Elmer (AmpliTaq) i Gibco BRL

4.3. Uvjeti za reakciju PCR

Provedite sljedeći program za specifične reakcije za biovar 1/2 i biovar 3/4/5:

1 ciklus od:	i.	5 minuta na 95 °C (denaturacija kalupa DNK)
35 ciklusa od:	ii.	30 sekundi na 95 °C (denaturacija kalupa DNK)
	iii.	30 sekundi na 58 °C (prianjanje početnica)
	iv.	45 sekundi na 72 °C (produljenje kopije)
1 ciklus od:	v.	5 minuta na 72 °C (konačno produljenje)
	vi.	držati na 4 °C

NB: Ovaj je program optimiziran za korištenje s uređajem za PCR (thermal cycler) MJ Research PTC 200. Za rad s drugim modelima uređaja možda će trebati prilagoditi trajanje ciklusa ii., iii. i iv.

4.4. Analiza produkta umnažanja pomoću restrikcijskog enzima

Produkti PCR-a umnoženi iz DNK bakterije *R. solanacearum* s početnicama Rs-1-F i Rs-1-R proizvode karakteristični polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata s enzimom *Bsm I* ili izoshizomerom (npr. Mva 1269 I) nakon inkubacije od 30 minuta na 65 °C. Produkti PCR-a umnoženi iz DNK bakterije *R. solanacearum* s početnicama Rs-1-F i Rs-3-R nemaju mjesta restrikcije.

5. **Pripremanje pufera za nanošenje**

5.1. Bromfenol plavilo (10 %-**tna osnovna otopina**)

Bromfenol plavilo	5 g
Destilirana voda (bidest)	50 ml

5.2. Pufer za nanošenje

Glicerol (86 %)	3,5 ml
Bromfenol plavilo (5,1)	300 µl
Destilirana voda (bidest)	6,2 ml

6. **10X tris-acetatni EDTA pufer (TAE), pH 8,0**

Tris pufer	48,40 g
Ledena octena kiselina	11,42 ml
EDTA (dinatrijeva sol)	3,72 g
Destilirana voda	1,00 l

Prije uporabe razrijedite do 1X.

Dostupan je i na tržištu (npr. Invitrogen ili ekvivalentni).

Dodatak 7.

Validirani reagensi za test FISH

1. **Oligo-sonde**

Sonda OLI-1-CY3 specifična za *R. solanacearum*: 5′-ggc agg tag caa gct acc ccc-3′

Nespecifična eubakterijska sonda EUB-338-FITC: 5′- gct gcc tcc cgt agg agt -3′

2. **Otopina za fiksiranje**

(UPOZORENJE! OTOPINA ZA FIKSIRANJE SADRŽI PARAFORMALDEHID KOJI JE TOKSIČAN. NOSITE RUKAVICE I NE UDIŠITE GA. PREPORUČUJE SE RADITI U DIGESTORU.)

i. Zagrijte 9 ml vode za molekularnu biologiju (npr. ultra čiste vode (UPW)) na oko 60 °C i dodajte 0,4 g paraformaldehida. Paraformaldehid se otapa nakon što dodate 5 kapi 1N NaOH i promiješate magnetnom miješalicom.

ii. Podesite pH na 7,0 dodajući 1 ml 0,1M fosfatnog pufera (PB; pH 7,0) i 5 kapi 1N HCl. Indikator papirom provjerite vrijednost pH i ako je potrebno podesite je pomoću HCl ili NaOH. *(UPOZORENJE! U OTOPINAMA S PARAFORMALDEHIDOM NE UPOTREBLJAVAJTE PH-METAR.)*

iii. Procijedite otopinu kroz membranski filtar od 0,22 µm te je do daljnje uporabe pohranite na 4 °C i zaštitite od prašine.

3. **3X Hybmix**

NaCl	2,7 M
Tris-HCl	60 mM (pH 7,4)
EDTA (sterilizirana filtriranjem i u autoklavu)	15 mM

Po potrebi razrijedite do 1X.

4. **Otopina za hibridizaciju**

1 X Hybmix	
Natrijev dodecil sulfat (SDS)	0,01 %
Formamid	30 %
Sonda EUB 338	5 ng/µl
Sonda OLI-1 ili OLI-2	5 ng/µl

Pripremite količine otopine za hibridizaciju prema izračunima u Tablici 1. Za svako stakalce (s 2 različita uzorka u duplikatu) treba 90 µl otopine za hibridizaciju. *VAŽNO: FORMAMID JE VEOMA TOKSIČAN I ZATO NOSITE RUKAVICE I PODUZMITE POTREBNE MJERE OPREZA!*

Tablica 1. Predložene količine za pripremanje smjese za hibridizaciju

Broj stakalaca	1	4	6	8	10
Sterilna ultra čista voda	23,1	92,4	138,6	184,8	231,0
3x hybmix	30,0	120,0	180,0	240,0	300,0
1 % SDS	0,9	3,6	5,4	7,2	9,0
Formamid	27,0	108,0	162,0	216,0	270,0
Sonda EUB 338 (100 ng/µl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Sonda OLI-1 ili OLI-2 (100 ng/µl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Ukupni volumen (µl)	90,0	360,0	540,0	720,0	900,0

NB: Sve otopine koje sadrže oligo-sonde osjetljive na svjetlost pohranite u tami na – 20 °C. Zaštitite ih od izravne sunčeve svjetlosti ili električnog svjetla tijekom uporabe.

5. **0,1M fosfatni pufer, pH 7,0**

Na_2HPO_4	8,52 g
KH_2PO_4	5,44 g
Destilirana voda	1,00 l

Rastopite sastojke, provjerite pH i sterilizirajte u autoklavu na 121 °C 15 minuta.

Dodatak 8.

Uzgoj patlidžana i rajčice

Sjeme rajčice (*Lycopersicon esculentum*) i patlidžana (*Solanum melongena*) posijte u pasterizirani kompost za sjeme. Sadnice presadite u pasterizirani kompost za lončanice nakon što se kotiledoni u cijelosti razviju (10 do 14 dana).

Prije inokulacije, rajčice i patlidžane treba uzgajati u stakleniku pod sljedećim okolišnim uvjetima:

Duljina dana	14 sati ili prirodna duljina dana ako je veća
Temperatura	dnevna: 21 do 24 °C noćna: 14 do 18 °C
Osjetljiva vrsta rajčice	‚Moneymaker'
Osjetljiva vrsta patlidžana	‚Black Beauty'
Dobavljači	vidjeti internetsku stranicu http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

POPIS LITERATURE

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. Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum, Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. International Journal of Systematic Bacteriology 46; 10-15.

28. Van Der Wolf, J.M., Bonants, P.J.M., Smith, J.J., Hagenaar, M., Nijhuis, E., Van Beckhoven, J.R.C., Saddler, G.S., 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.

PRILOG III.

1. Kod svake sumnje na pojavu, za koju se testom ili testovima probira dobije pozitivan rezultat u skladu s odgovarajućim metodama koje su u Prilogu II. utvrđene za navedeni biljni materijal i za sve druge slučajeve, treba, dok se taj rezultat ne potvrdi ili opovrgne navedenim metodama, zadržati i primjereno čuvati do okončanja tih metoda:

   — sve uzorkovane gomolje i, kad god je to moguće, sve uzorkovane biljke

   — sav preostali ekstrakt i dodatni materijal pripremljen za test(ove) probira, npr. stakalca za imunofluorescenciju

   i

   — svu bitnu dokumentaciju

   Čuvanje gomolja omogućit će da se, prema potrebi, obavi ispitivanje sorte.

2. Ako se potvrdi prisutnost organizma, treba zadržati i primjereno čuvati najmanje još mjesec dana nakon postupka obavješćivanja predviđenog člankom 5. stavkom 2.:

   — materijal naveden u stavku 1.

   — uzorak materijala od zaražene rajčice ili patlidžana inokuliranog ekstraktom gomolja ili biljke, prema potrebi

   i

   — izdvojenu kulturu organizma.

PRILOG IV.

Istraživanje iz članka 5. stavka 1. točke (a) podtočke i. obuhvaća, prema potrebi, sljedeće elemente:

i. mjesta proizvodnje

— na kojima se uzgaja ili se uzgajao krumpir koji je klonski povezan s krumpirom za koji je utvrđeno da je zaražen organizmom,

— na kojima se uzgajaju ili su se uzgajale rajčice koje potječu iz istog izvora kao i rajčice, za koji je utvrđeno da je zaražen organizmom,

— na kojima se uzgajaju ili su se uzgajali krumpir ili rajčica koji su stavljeni pod službeni nadzor zbog sumnje na pojavu organizma,

— na kojima se uzgaja ili se uzgajao krumpir koji je klonski srodan s krumpirom proizvedenim na mjestu proizvodnje za koje je utvrđeno da je zaraženo organizmom,

— na kojima se uzgajaju krumpir ili rajčica i koja se nalaze u blizini zaraženih mjesta proizvodnje, uključujući mjesta proizvodnje koja koriste istu opremu i objekte bilo izravno ili preko posrednika,

— koja za navodnjavanje ili prskanje koriste površinsku vodu iz bilo kojeg izvora za koji je potvrđeno ili se sumnja da je zaražen organizmom,

— koja za navodnjavanje ili prskanje koriste površinsku vodu iz izvora kojim se služe i mjesta proizvodnje za koje je potvrđeno ili se sumnja da su zaražena organizmom,

— koja su poplavljena ili su bila poplavljena površinskom vodom za koje je potvrđeno ili se sumnja da su zaražene organizmom;

i

ii. površinske vode koje se koriste za navodnjavanje ili prskanje ili su poplavile jedno ili više polja ili mjesta proizvodnje za koje je potvrđeno da su zaraženi organizmom.

PRILOG V.

1. Pri određivanju opsega vjerojatne zaraze u skladu s člankom 5. stavkom 1. točkom (a) podtočkom iii. i člankom 5. stavkom 1. točkom (c) podtočkom iii., treba uzeti u obzir i sljedeće elemente:

— navedeni biljni materijal uzgojen na mjestu proizvodnje koje je označeno kao zaraženo u skladu s člankom 5. stavkom 1. točkom (a) podtočkom ii.,

— mjesto(-a) proizvodnje koja su u bilo kakvoj vezi s proizvodnjom navedenog biljnog materijala koji je označen kao zaražen, uključujući i ona na kojima se, izravno ili preko posrednika, koristi ista oprema za proizvodnju i objekti,

— navedeni biljni materijal koji je proizveden na mjestu(-ima) proizvodnje iz prethodne alineje ili koji se nalazio na tim mjestima proizvodnje u vrijeme dok je biljni materijal koji je označen kao zaražen u skladu s člankom 5. stavkom 1. točkom (a) podtočkom ii. bio prisutan na mjestu proizvodnje iz prve alineje,

— objekte u kojima se radi s navedenim biljnim materijalom koje potječe s mjesta proizvodnje iz gornje alineje,

— svaki stroj, vozilo, brod, skladište, ili njihov dio te druge predmete, uključujući i materijal za pakiranje, koji su mogli doći u dodir s navedenim biljnim materijalom koje je označeno kao zaraženo u skladu s člankom 5. stavkom 1. točkom (a) podtočkom ii.,

— sav navedeni biljni materijal koje je bio uskladišten ili u doticaju s nekim od objekata ili predmeta iz prethodne alineje prije njihova čišćenja i dezinfekcije,

— na temelju istraživanja i testiranja iz članka 5. stavka 1. točke (a) podtočke i. gomolje ili biljke krumpira koji su sestrinski ili roditeljski klonski povezani s navedenim biljnim materijalom koje je označeno kao zaraženo u skladu s člankom 5. stavkom 1. točkom (a) podtočkom ii., a u slučaju rajčice, one biljke koje potječu iz istog izvora kao taj navedeni biljni materijal, i koji se, unatoč pozitivnim rezultatima testiranja na organizam, smatraju vjerojatno zaraženima zbog klonske srodnosti. Može se provesti i test sortnosti da bi se provjerio identitet zaraženih i klonski srodnih gomolja ili biljaka,

— mjesto(-a) proizvodnje navedenog biljnog materijala o kojemu se govori u prethodnoj alineji,

— mjesto(-a) proizvodnje navedenog biljnog materijala na kojima se za navodnjavanje ili prskanje upotrebljava voda koja je označena kao zaražena u skladu s člankom 5. stavkom 1. točkom (c) podtočkom ii.,

— navedeni biljni materijal proizveden na poljima koja su bila poplavljena površinskom vodom za koju je potvrđeno da je zaražena.

2. Pri određivanju mogućeg širenja o kojemu se govori u članku 5. stavku 1. točki (a) podtočki iv. i članku 5. stavku 1. točki (c) podtočki iii., treba uzeti u obzir sljedeće elemente:

i. u slučajevima iz članka 5. stavka 1. točke (a) podtočke iv.:

— blizinu drugih mjesta proizvodnje gdje se uzgaja navedeni biljni materijal,

— zajedničku proizvodnju i uporabu zaliha sjemenskog krumpira,

— mjesta proizvodnje na kojima se upotrebljava površinska voda za navodnjavanje ili prskanje navedenog biljnog materijala, ako postoji ili je postojala opasnost od površinskog dotjecanja vode ili poplavljivanja vodom s mjesta proizvodnje koja su označena kao zaražena u skladu s člankom 5. stavkom 1. točkom (a) podtočkom ii.,

ii. u slučajevima kada je površinska voda označena kao zaražena u skladu s člankom 5. stavkom 1. točkom (c) podtočkom ii.:

— mjesto(-a) proizvodnje navedenog biljnog materijala koja graniče ili su ugrožena poplavljivanjem površinskom vodom koja je označena kao zaražena,

— svako zasebno područje navodnjavanja koje je u vezi s površinskom vodom koja je označena kao zaražena,

— vode povezane s površinskom vodom koja je označena kao zaražena, uzimajući u obzir:

— smjer i brzinu toka vode označene kao zaražene,

— prisutnost samoniklih biljaka domaćina iz porodice Solanaceae.

3. Obavijest iz članka 5. stavka 2. prvog podstavka dostavlja se kako slijedi:

— odmah nakon što se laboratorijskim testiranjem provedenim prema metodama koje su utvrđene u Prilogu II. potvrdi prisutnost organizma, obvezno navodeći:

— za krumpir:

(a) naziv sorte partije,

(b) namjenu (merkantilni, sjemenski itd.) i, ovisno o slučaju, kategoriju sjemena,

— za biljke rajčice, naziv sorte i partiju, i, prema potrebi, kategoriju,

— ne dovodeći u pitanje zahtjeve glede obavješćivanja o sumnji na pojavu iz članka 4. stavka 3., ako postoji opasnost od zaraze navedenog biljnog materijala iz drugih država članica ili u druge države članice, država članica u kojoj je potvrđena pojava odmah dostavlja dotičnim državama članicama podatke koji su potrebni za udovoljavanje članku 5. stavku 3., i to:

(a) naziv sorte krumpira ili rajčice u partiji,

(b) naziv i adresu pošiljatelja i primatelja,

(c) datum dostave partije krumpira ili rajčice,

(d) veličinu isporučene partije krumpira ili rajčice,

(e) kopiju biljne putovnice ili, prema potrebi, barem njezin broj, ili, prema potrebi, registracijski broj proizvođača ili trgovca te kopiju dostavnice.

Komisija mora odmah biti obaviještena o slanju ovih podataka.

4. Dodatna obavijest iz članka 5. stavka 2. drugog podstavka sadrži sljedeće:

nakon završetka svih istraživanja, za svaki pojedini slučaj:

(a) datum kada je zaraza potvrđena,

(b) kratak opis istrage provedene radi identifikacije izvora i mogućeg širenja zaraze, uključujući i podatke o opsegu uzorkovanja,

(c) informacije o identificiranim ili pretpostavljenim izvorima zaraze,

(d) pojedinosti o opsegu označene zaraze, uključujući broj mjesta proizvodnje i, za krumpir, broj partija s nazivom sorte i, kada je riječ o sjemenskom krumpiru, kategoriju,

(e) pojedinosti o sigurnosnom području, uključujući broj mjesta proizvodnje koja nisu označena kao zaražena, ali su uključena u sigurnosno područje,

(f) pojedinosti o vodi koja je proglašena zaraženom, uključujući naziv i lokaciju vode te opseg proglašavanja zaraze/zabrane navodnjavanja,

(g) za sve pošiljke ili partije biljaka rajčice označene kao zaražene, svjedodžbe propisane člankom 13. stavkom 1. točkom ii. Direktive 2000/29/EZ i broj biljne putovnice, u skladu s popisom iz Priloga V, dijela A, odjeljka 1.2.2. Direktive 2000/29/EZ,

(h) sve druge informacije o potvrđenom izbijanju bolesti koje može zatražiti Komisija.

PRILOG VI.

1. Mjere iz članka 6. stavka 1. obuhvaćaju:

— uporabu kao hrane za životinje nakon odgovarajuće toplinske obrade koja ne ostavlja nikakvu mogućnost preživljavanja štetnog organizma,

ili

— odlaganje na službeno odobrenom mjestu za zbrinjavanje otpada, za koje je utvrđeno da ne postoji opasnost od širenja organizma u okoliš, npr. cijeđenjem kroz pore tla do poljoprivrednog zemljišta ili doticajem s vodom koja bi se mogla upotrijebiti za navodnjavanje poljoprivrednog zemljišta,

ili

— spaljivanje,

ili

— industrijsku preradu tako što će se izravno i odmah dopremiti u objekt za preradu u kojemu postoji službeno odobrena oprema za zbrinjavanje otpada i za koji je utvrđeno da ne postoji opasnost od širenja organizma te u kojemu postoji sustav za čišćenje i dezinfekciju barem onih prijevoznih sredstava koja napuštaju objekt za preradu,

ili

— druge mjere, pod uvjetom da je utvrđeno da nema opasnosti od širenja organizma; o takvim mjerama i njihovoj opravdanosti treba izvijestiti Komisiju i ostale države članice.

Sav preostali otpad koji je povezan s gore navedenim mjerama ili je nastao kao rezultat tih mjera mora biti zbrinut službeno odobrenim metodama u skladu s Prilogom VII. Direktivi.

2. Odgovarajuća uporaba ili zbrinjavanje navedenog biljnog materijala iz članka 6. stavka 2. odvija se na dolje opisani način pod nadzorom odgovornih službenih tijela države članice ili država članica, pri čemu ta tijela moraju razmjenjivati informacije kako bi se osigurao stalni nadzor, a odgovorno službeno tijelo države članice u kojoj bi se krumpir trebao pakirati ili prerađivati mora odobriti objekte za zbrinjavanje otpada iz prve i druge alineje:

i. kada je riječ o gomoljima krumpira,

— njihova uporaba kao merkantilnog krumpira namijenjenog prehrani, koji je pakiran na mjestima koja raspolažu odgovarajućom opremom za zbrinjavanje otpada i koji je spreman za neposrednu dostavu i uporabu bez naknadnog prepakiranja. Sa sjemenskim krumpirom dopušteno je rukovati u tim istim mjestima samo ako se radi odvojeno ili nakon čišćenja i dezinfekcije,

ili

— njihova uporaba kao merkantilnog krumpira namijenjenog industrijskoj preradi, uz izravnu i brzu dostavu do objekta za preradu, koji mora raspolagati odgovarajućom opremom za zbrinjavanje otpada i sustavom za čišćenje i dezinfekciju barem onih prijevoznih sredstava koji napuštaju objekt za preradu,

ili

— neki drugi oblik uporabe ili zbrinjavanja, pod uvjetom da se utvrdi da nema opasnosti od širenja organizma i uz odobrenje navedenih odgovornih službenih tijela.

ii. kada je riječ o ostalim dijelovima biljaka, uključujući ostatke stabljika i lišća:

— uništenje,

ili

— neki drugi oblik uporabe ili zbrinjavanja, pod uvjetom da se utvrdi da nema opasnosti od širenja organizma i uz odobrenje navedenih odgovornih službenih tijela.

3. U prikladne načine dekontaminacije predmeta iz članka 6. stavka 3. spadaju čišćenje i, prema potrebi, dezinficiranje, kojima se otklanja svaka prepoznatljiva opasnost od širenja organizma i koji se moraju obavljati pod nadzorom odgovornih službenih tijela država članica.

4 U sigurnosnoj zoni čije su granice utvrđene u skladu s člankom 5. stavkom 1. točkom (a) podtočkom iv. i točkom (c) podtočkom iii. i o kojoj se govori u članku 6. stavku 4. države članice moraju provoditi sljedeće mjere:

4.1. U slučajevima kada su mjesta proizvodnje označena kao zaražena u skladu s člankom 5. stavkom 1. točkom (a) podtočkom ii.:

(a) na poljima ili prostorima za zaštićenu biljnu proizvodnju koji su označeni kao zaraženi u skladu s člankom 5. stavkom 1. točkom (a) podtočkom ii. ili:

i. u najmanje četiri vegetacijske godine nakon godine kada je itvrđena zaraza,

— provode se mjere za uklanjanje samoniklih biljaka krumpira i rajčice te drugih biljaka domaćina organizma, uključujući korove iz porodice Solanaceae,

i

— ne smiju se saditi:

— gomolji ili biljke krumpira te pravo sjeme krumpira,

— biljke i sjeme rajčice,

— a uzimajući u obzir biologiju organizma:

— ni druge biljke domaćini,

— biljne vrsta iz roda *Brassica* za koje je utvrđeno da omogućavaju preživljavanje organizma,

— kulture za koje je utvrđeno da omogućuju širenje štetnog organizma;

— u prvoj sezoni proizvodnje krumpira ili rajčice koja slijedi nakon razdoblja iz prethodne alineje, pod uvjetom da na polju najmanje dvije uzastopne vegetacijske godine prije sadnje tijekom provođenja službenih pregleda nisu nađene samonikle biljke krumpira i rajčice te druge biljke domaćini, uključujući korove iz porodice Solanaceae,

— u slučaju krumpira, dopušta se proizvodnja isključivo merkantilnog krumpira,

— u slučaju krumpira i rajčice, proizvedeni gomolji krumpira ili biljke rajčice, kada je to potrebno, testiraju se u skladu s postupkom iz Priloga II;

— u sezoni proizvodnje krumpira ili rajčice koja slijedi nakon one iz prethodne alineje, uz odgovarajući plodored, koji mora biti najmanje dvogodišnji ako se želi proizvoditi sjemenski krumpir, provodi se službeno istraživanje u skladu s člankom 2. stavkom 1;

ili

ii. u idućih pet vegetacijskih godina nakon godine kada je utvrđena zaraza:

— provode se mjere za uklanjanje samoniklih biljaka krumpira i rajčice te drugih prirodno prisutnih biljaka domaćina organizma, uključujući korove iz porodice Solanaceae,

i

— prve tri godine polje se održava na ugaru ili se siju žitarice ovisno o utvrđenoj opasnosti, ili se održava kao trajni pašnjak s čestom niskom košnjom ili intenzivnom ispašom, ili se koristi za proizvodnju sjemenskih trava, nakon čega se u sljedeće dvije uzastopne godine sade biljke koje nisu domaćini organizma i za koje nije utvrđena opasnost od preživljavanja ili širenja organizma,

— u prvoj sezoni proizvodnje krumpira ili rajčice, koja slijedi nakon razdoblja iz prethodne alineje, pod uvjetom da tijekom provođenja službenih pregleda u najmanje dvije uzastopne vegetacijske godine prije sadnje na polju nisu nađene samonikle biljke krumpira i rajčice te drugih biljaka domaćina, uključujući korove iz porodice Solanaceae,

— u slučaju krumpira, dopušta se proizvodnja sjemenskog i merkantilnog krumpira,

— proizvedeni gomolji krumpira ili biljke rajčice prema potrebi se testiraju u skladu s postupkom iz Priloga II;

(b) na svim ostalim poljima unutar zaraženog mjesta proizvodnje, pod uvjetom da se odgovornom nadležnom tijelu dokaže da je otklonjena opasnost od samoniklih biljaka krumpira i rajčice te drugih prirodno rastućih biljaka domaćina organizma, uključujući korove iz porodice Solanaceae:

— u vegetacijskoj godini koja slijedi nakon godine u kojoj je utvrđena zaraza,

— ne smiju se saditi odnosno sijati gomolji ili biljke krumpira, pravo sjeme krumpira i druge biljke domaćini organizma,

ili

— u slučaju gomolja krumpira, dopušta se sadnja certificiranog sjemenskog krumpira namijenjenog isključivo proizvodnji merkantilnog krumpira,

— u slučaju biljaka rajčice, dopušta se sadnja biljaka rajčice uzgojenih iz sjemena koje udovoljava zahtjevima Direktive 2000/29/EZ isključivo za proizvodnju plodova;

— u drugoj vegetacijskoj godini koja slijedi nakon godine u kojoj je utvrđena zaraza:

— u slučaju krumpira, za sjemensku ili merkantilnu proizvodnju dopušta se sadnja samo certificiranog sjemenskog krumpira ili sjemenskog krumpira koji je službeno testiran kako bi se potvrdila odsutnost smeđe truleži i koji je proizveden pod službenim nadzorom na mjestima proizvodnje koja nisu navedena pod 4.1.,

— u slučaju rajčice, za proizvodnju presadnica ili plodova dopušta se sadnja samo onih biljaka rajčice koje su uzgojene iz sjemena koje udovoljava zahtjevima Direktive 2000/29/EZ ili, ako se radi o vegetativnom razmnožavanju, iz biljaka rajčice proizvedenih iz takvog sjemena i uzgojenih pod službenim nadzorom na mjestima proizvodnje koja nisu navedena pod 4.1.;

— najmanje još u trećoj vegetacijskoj godini koja slijedi nakon godine u kojoj je utvrđena zaraza:

— u slučaju krumpira, za sjemensku ili merkantilnu proizvodnju dopušta se sadnja samo certificiranog sjemenskog krumpira ili sjemenskog krumpira proizvedenog pod službenim nadzorom iz certificiranog sjemenskog krumpira,

— u slučaju rajčice, za proizvodnju presadnica ili plodova dopušta se sadnja samo onih biljaka rajčice koje su uzgojene iz sjemena koje udovoljava zahtjevima Direktive 2000/29/EZ ili iz biljaka rajčice koje su pod službenim nadzorom uzgojene iz takvih biljaka;

— u svakoj vegetacijskoj godini iz prethodnih alineja poduzimaju se mjere uklanjanja samoniklih biljaka krumpira i drugih prirodno rastućih biljaka domaćina organizma ako su prisutne te se provodi službeni pregled usjeva u odgovarajućim vremenskim razdobljima, a na svakom polju na kojemu se uzgaja krumpir mora se obavljati testiranje proizvedenog krumpira u skladu s postupkom iz Priloga II.;

(c) odmah nakon utvrđivanja zaraze u skladu s člankom 5. stavkom 1. točkom (a) podtočkom ii. i nakon prve iduće vegetacijske godine:

— svi strojevi i skladišni prostori na mjestu proizvodnje koji su se koristili u proizvodnji krumpira ili rajčice moraju se očistiti i, po potrebi, dezinficirati primjenom odgovarajućih metoda iz točke 3,

— prema potrebi, provode se službene kontrole programa navodnjavanja i prskanja, uključujući i njihovu zabranu, radi sprečavanja širenja organizma,

(d) u prostoru namijenjenom zaštićenoj proizvodnji bilja koji je sukladno članku 5. stavku 1. točki (a) podtočki ii. označen kao zaražen, gdje je moguća potpuna zamjena supstrata za uzgoj,

— ne smiju se saditi odnosno sijati gomolji, biljke ili pravo sjeme krumpira niti druge biljke domaćini organizma, uključujući biljke i sjeme rajčice, sve dok se na proizvodnoj jedinici ne provedu službeno nadzirane mjere uništavanja organizma i uklone sve biljke domaćini, uključujući, kao minimalnu mjeru, potpunu zamjenu supstrata za uzgoj te čišćenje i, prema potrebi, dezinfekciju dotične jedinice i cjelokupne opreme, i sve dok, nakon provedbe tih mjera, odgovorna službena tijela ne odobre proizvodnju krumpira ili rajčice,

i

— za proizvodnju krumpira mora se koristiti certificirani sjemenski krumpir ili mini-gomolji ili mikro-bilje koji potječu iz testiranih izvora,

— za proizvodnju rajčice mora se koristiti sjeme koje udovoljava zahtjevima Direktive 2000/29/EZ ili, u slučaju vegetativnog razmnožavanja, biljke rajčice proizvedene od takvog sjemena i uzgojene pod službenim nadzorom,

— prema potrebi, provode se službene kontrole programa navodnjavanja i prskanja, uključujući i njihovu zabranu, radi sprečavanja širenja organizma;

4.2. ne dovodeći u pitanje mjere navedene pod 4.1., u sigurnosnom području države članice moraju:

(a) odmah nakon utvrđivanja zaraze osigurati da, prema potrebi, svi strojevi i skladišni prostori koji se nalaze na tim posjedima i koji su se koristili u proizvodnji krumpira ili rajčice budu očišćeni i dezinficirani primjenom metoda iz točke 3.,

(b) odmah i tijekom najmanje tri vegetacijske godine koje slijede iza one u kojoj je utvrđena zaraza:

(ba) u slučajevima kada je sigurnosna zona utvrđena u skladu s člankom 5. stavkom 1. točkom (a) podtočkom iv.,

— osigurati da njihova odgovorna nadležna tijela nadziru posjede na kojima se uzgajaju ili skladište gomolji krumpira ili rajčica ili na kojima se njima rukuje, uključujući i posjede na kojima se po ugovoru koriste strojevi za proizvodnju krumpira ili rajčice,

— zahtijevati da se za sve usjeve krumpira unutar tog područja sije samo certificirano sjeme ili sjeme proizvedeno pod službenim nadzorom i da se nakon vađenja testira sjemenski krumpir proizveden na mjestima proizvodnje za koja je utvrđeno da su vjerojatno zaražena prema članku 5. stavku 1. točki (a) podtočki iii.,

— zahtijevati da se na svim posjedima unutar tog područja s proizvedenim sjemenskim krumpirom postupa odvojeno od merkantilnog krumpira, ili da se obavi čišćenje i, prema potrebi, dezinfekcija između postupanja sa sjemenskim i merkantilnim krumpirom,

— zahtijevati da se za sve usjeve rajčice unutar tog područja sade samo biljke rajčice uzgojene iz sjemena koje udovoljava zahtjevima Direktive 2000/29/EZ ili, u slučaju vegetativnog razmnožavanja, iz biljaka rajčice koje su proizvedene iz takvog sjemena i uzgojene pod službenim nadzorom,

— provoditi službeno istraživanje navedeno u članku 2. stavku 1.;

(bb) u slučajevima kada je površinska voda označena kao zaražena u skladu s člankom 5. stavkom 1. točkom (c) podtočkom ii. ili kada je ona jedan od čimbenika koji prema Prilogu V. točki 2. utječu na moguće širenje organizma,

— obavljati godišnje istraživanje u odgovarajućim vremenskim razdobljima, uključujući uzimanje uzoraka površinske vode i, prema potrebi, biljaka domaćina iz porodice Solanaceae iz odgovarajućih izvora vode, kao i testiranje u skladu s odgovarajućim metodama iz Priloga II. za sav navedeni biljni materijal i druge slučajeve,

— uvesti službene kontrole programa navodnjavanja i prskanja, uključujući i zabranu uporabe vode koja je označena kao zaražena za navodnjavanje i prskanje navedenog biljnog materijala i, prema potrebi, drugih biljaka domaćina radi sprečavanja širenja štetnog organizma. Zabrana se može preispitati na temelju rezultata navedenoga godišnjeg istraživanja, a proglašenje zaraze može se opozvati ako se odgovornim službenim tijelima dokaže da površinska voda više nije zaražena. Korištenje vode čija je uporaba zabranjena može se dopustiti, pod službenim nadzorom, za navodnjavanje i prskanje biljaka domaćina ako se primjenjuju službeno odobreni postupci kojima se uništava organizam i sprečava njegovo širenje,

— u slučajevima kada je tekući otpad zaražen, uvesti službene kontrole zbrinjavanja krutog ili tekućeg otpada koji nastaje u objektima za industrijsku preradu ili pakiranje u kojima se rukuje navedenim biljnim materijalom;

(c) prema potrebi, uspostaviti program zamjene svih zaliha sjemenskog krumpira u odgovarajućem vremenskom razdoblju.

PRILOG VII.

Službeno odobrene metode zbrinjavanja otpada o kojima se govori u Prilogu VI. stavku 1. moraju biti u skladu sa sljedećim odredbama tako da se otkloni svaka prepoznatljiva opasnost od širenja organizma:

i. otpaci krumpira i rajčice (uključujući odbačeni krumpir, koru i rajčicu) i svi drugi kruti otpaci koji su u vezi s krumpirom i rajčicom (uključujući tlo, kamenje i druge ostatke), moraju se:

— ili odložiti na službeno odobreno mjesto za zbrinjavanje otpada, za koje je utvrđeno da ne postoji opasnost od širenja organizma u okoliš, npr. cijeđenjem kroz pore tla do poljoprivrednog zemljišta ili doticajem s izvorima vode koja bi se mogla upotrijebiti za navodnjavanje poljoprivrednog zemljišta. Otpaci se prevoze izravno na odlagalište, u zatvorenom prijevoznom sredstvu, tako da ne postoji opasnost od gubitka otpada

ili

— spaliti

ili

— zbrinuti primjenom drugih mjera, pod uvjetom da je utvrđeno da ne postoji opasnost od širenja organizma; o tim se mjerama mora obavijestiti Komisija i ostale države članice.

ii. tekući otpad: tekući otpad koji sadrži raspršene krute čestice mora se prije zbrinjavanja filtrirati ili obraditi postupkom taloženja radi uklanjanja krutih čestica. Krute čestice se nakon toga uklanjaju na način naveden u podstavku i.

Tekući se otpad potom:

— ili zagrijava do temperature od najmanje 60 °C u središtu, najmanje 30 minuta prije zbrinjavanja

ili

— uz službeno odobrenje i pod službenim nadzorom, zbrinjava na drugi način koji onemogućava da otpaci dođu u doticaj s poljoprivrednim zemljištem ili vodom koja se može upotrijebiti za navodnjavanje poljoprivrednog zemljišta. Pojedinosti o tim mjerama dostavljaju se ostalim državama članicama i Komisiji.

Različiti postupci opisani u ovom Prilogu primjenjuju se i na otpad koji nastaje tijekom rukovanja, zbrinjavanja i prerade zaraženih partija.