

32006L0063

L 206/36

ОФИЦИАЛЕН ВЕСТНИК НА ЕВРОПЕЙСКИЯ СЪЮЗ

27.7.2006

ДИРЕКТИВА 2006/63/ЕО НА КОМИСИЯТА**от 14 юли 2006 година****за изменение на приложения от II до VII към Директива 98/57/ЕО на Съвета за контрол на *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.**

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаването на Европейската общност,

като взе предвид Директива 98/57/ЕО на Съвета от 20 юли 1998 ⁽¹⁾ г. за контрола на *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., и по-специално член 11 от нея,

като има предвид, че:

- (1) *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., причинителят на гъбна болест по картофите и бактериен увяхване, е един от основните вредители по картофите и домати (наричан по-нататък в текста вредителят).
- (2) Вредителят все още се среща в някои части на Общността.
- (3) В Директива 98/57/ЕО са определени подробните мерки, които следва да се вземат в държавите-членки срещу вредителя, за да бъде открит и да се определи разпространението му; да се предотврати появата и пренасянето му; и, ако бъде открит, да се предотврати пренасянето му и да се контролира, с цел да бъде унищожен.
- (4) Оттогава настъпиха значителни изменения в разбирането на биологията, процедурите за откриване и определяне на вредителя; освен това натрупаният практически опит, свързан с контрола върху вредителите, налага да се направи преглед на няколко технически разпоредби, свързани с мерките за контрол.
- (5) В резултат на тези изменения е очевидна необходимостта от преглед и актуализиране на мерките, включени в някои приложения към Директива 98/57/ЕО.
- (6) По отношение на процедурите за откриване и определяне на вредителя, е включен съвременен метод за откриване — флуоресцентна *in-situ* хибридизация. Включени са също и подобренията на метода на полимеразна верижна реакция,

както и подобренията на различни технически елементи на използваната процедура за откриване и определяне на вредителя, и методи за откриване и определяне на вредителя в други растения гостоприемници освен картофа, както и във водата и почвата.

- (7) По отношение на техническите елементи на мерките за контрол се усъвършенстват разпоредбите за: начина на съхраняване на пробите, подложени на тестване, за да се осигури обратно проследяване на вредителя; необходимите елементи за определяне на степента на вероятна зараза; подробните изисквания към уведомяването, което се прави за всяко потвърдено наличие на вредителя и на съответната заражена зона; мерките, които трябва да се вземат в производствените участъци, означени като заразени, и в рамките на района на разпространение. Освен това са включени и някои разпоредби за домати, за да се вземе в по-голяма степен под внимание значението на това растение като гостоприемник на вредителя.
- (8) Мерките, предвидени в настоящата директива, са в съответствие със становището на Постоянния фитосанитарен комитет,

ПРИЕ НАСТОЯЩАТА ДИРЕКТИВА:

Член 1

Приложеният от II до VII към Директива 98/57/ЕО се заменят със съответните текстове в приложението към настоящата директива.

Член 2

1. Държавите-членки приемат и публикуват не по-късно от 31 март 2007 г. законите, подзаконовите и административните разпоредби, необходими, за да се съобразят с настоящата директива. Те незабавно предоставят на Комисията текста на разпоредбите и таблицата за съответствие между тези разпоредби и директивата.

Те прилагат тези разпоредби от 1 април 2007 г.

Когато държавите-членки приемат тези разпоредби, в тях се съдържа позоваване на настоящата директива или то се извършва при официалното им публикуване. Условието и редът на позоваване се определят от държавите-членки.

⁽¹⁾ ОВ L 235, 21.8.1998 г., стр. 1.

2. Държавите-членки съобщават на Комисията текстовете на основните разпоредби от националното законодателство, които те приемат в областта, уредена с настоящата директива.

Член 3

Настоящата директива влиза сила на третия ден от публикуването ѝ в *Официален вестник на Европейските общности*.

Член 4

Адресати на настоящата директива са държавите-членки.

Съставено в Брюксел на 14 юли 2006 година.

За Комисията

Markos KYPRIANOU

Член на Комисията

ПРИЛОЖЕНИЕ

„ПРИЛОЖЕНИЕ II

ТЕСТОВА СХЕМА ЗА ДИАГНОСТИКА, ОТКРИВАНЕ И ОПРЕДЕЛЯНЕ НА *RALSTONIA SOLANACEARUM* (SMITH) YABUUCHI ET AL.

ОБХВАТ НА ТЕСТОВАТА СХЕМА

Настоящата схема описва различните процедури, включени в:

- i) диагностика на бактериалното кафяво гниене по картофените клубени и бактериалното увяхване при картофи, домати и други растения гостоприемници;
- ii) откриване на *Ralstonia solanacearum* в проби, взети от картофени клубени, картофени растения, домати растения и други растения гостоприемници, вода и почва;
- iii) определяне на *Ralstonia solanacearum* (*R. Solanacearum*).

СЪДЪРЖАНИЕ

	Страница
Общи принципи.....	61
РАЗДЕЛ I: Прилагане на тестовата схема	61
1. Схема за диагностициране за наличие на бактериално кафяво гниене по картофените клубени и бактериално увяхване при картофени, домати и други растения гостоприемници със симптоми на бактериално кафяво гниене или бактериално увяхване	61
2. Схема за откриване и определяне на <i>R. Solanacearum</i> в проби от асимптоматични картофени клубени	64
3. Схема за откриване и определяне на <i>R. Solanacearum</i> в проби от асимптоматични, картофени, домати или други растения гостоприемници	67
РАЗДЕЛ II: Подробни методи за откриване и определяне на <i>R. Solanacearum</i> в картофени клубени и картофени, домати или други растения гостоприемници със симптоми на бактериално кафяво гниене или бактериално увяхване	69
1. Симптоми	69
2. Бързи скринингови тестове	69
3. Процедура за изолиране	70
4. Тестове за определяне на <i>R. Solanacearum</i>	70
РАЗДЕЛ III: 1. Подробни методи за откриване и определяне на <i>R. Solanacearum</i> в проби от асимптоматични картофени клубени	70
1.1. Изготвяне на проби	70
1.2. Тестване	72
2. Подробни методи за откриване и определяне на <i>R. Solanacearum</i> в проби от асимптоматични картофени, домати или други растения	72
2.1. Изготвяне на проби	72
2.2. Тестване	73
РАЗДЕЛ IV: 1. Схема за откриване и определяне на <i>R. Solanacearum</i> във вода	74
2. Методи за откриване и определяне на <i>R. Solanacearum</i> в почва	76
2.1. Изготвяне на проби	76
2.2. Тестване	76
РАЗДЕЛ V: 1. Схема за откриване и определяне на <i>R. Solanacearum</i> в почва	77
2. Методи за откриване и определяне на <i>R. Solanacearum</i> в почва	79
2.1. Изготвяне на проби	79
2.2. Тестване	79

	Страница
РАЗДЕЛ VI: Оптимизирани протоколи за откриване и определяне на <i>R. Solanacearum</i>	79
А Тестове за диагностициране и откриване	79
1. Стриминг тест на стеблото	79
2. Откриване на поли- β -хидроксibuтиратни гранули	79
3. Серологични аглутинационни тестове.....	80
4. Селективна изолация	81
4.1. Селективно посяване.....	81
4.2. Процедура на обогатяване	81
5. Имунофлуоресцентен тест (IF тест).....	82
6. Тестване на полимеразна верижна реакция (PCR тест)	85
6.1. Методи за почистване на ДНК.....	86
а) Метод на Пастрик (2000)	86
б) Други методи	86
6.2. PCR.....	87
6.3. Анализ на PCR продукт	87
7. Флуоресцентен in-situ хибридационен тест (FISH тест)	88
8. Тествания на ензимно свързани имуносорбентни изследвания (Елайза тестове)	90
а) Индиректен Елайза.....	90
б) DASi Елайза	91
9. Тест на биологична проба	92
Б. Идентификационни тестове	93
1. Хранителни и ензимни идентификационни тестове	93
2. IF тест	93
3. Елайза тест	94
4. PCR тест	94
5. FISH тест	94
6. Профилиране на мастни киселини (FAP)	94
7. Методи за характеризиране на шамове	94
7.1. Определяне на биовар	94
7.2. Геномен финтърпринтинг	95
7.3. PCR методи	95
В. Тест за потвърждаване	95
Допълнение 1 Лаборатории, които участват в оптимизирането и валидирането на протоколите	97
Допълнение 2 Среда за изолиране и култивиране на <i>R. solanacearum</i>	98
Допълнение 3 А) Стандартизиран контролен материал с търговско предназначение	100
Б) Изготвяне на контроли	101
Допълнение 4 Буфери за тестателни процедури	103
Допълнение 5 Определяне на нивото на заразяване в IF и FISH тестове	106
Допълнение 6 Валидирани PCR протоколи и реагенти.....	107
Допълнение 7 Валидирани реагенти за FISH тест	112
Допълнение 8 Кондициониране на култури от син домат и домат	114
Източници	115

ОБЩИ ПРИНЦИПИ

В допълненията са дадени оптимизирани протоколи за различните методи, валидирани реагенти и подробна информация за подготвяне на тестовите и контролни материали. Списъкът на лабораториите, които са участвали в оптимизирането и валидирането на протоколите, е даден в допълнение 1.

Тъй като протоколите включват откриване на карантинен вредител и обикновено включват използването на жизнеспособни култури на *R. Solanacearum* като контролен материал, се налага процедурите да се извършват при подходящи карантинни условия със съответстващи възможности за депониране на отпадъците и в рамките на условията на съответстващи лицензи, издадени от официалните органи за растителна карантина.

Тестовите параметри трябва да осигуряват съвместимо и възпроизводимо откриване на нивата на *R. Solanacearum* при определените прагове на избраните методи.

Прецизната подготовка на положителни контроли е задължителна.

Тестването в съответствие със задължителните прагове означава също правилно разполагане, поддържане и калибриране на оборудването, внимателна транспортиране и съхраняване на реагентите и осигуряване на всички мерки за предотвратяване на заразяване между пробите, например отделяне на положителните контроли от тестовите пробите за тестване. За избягване на административни и други грешки, особено по отношение на етикетирането и документацията, трябва да се прилагат стандартите за управление на качеството.

Предполагано наличие, посочено в член 4, параграф 2 от Директива 98/57/ЕО, означава положителен резултат при диагностични или скринингови тестове, извършени върху проба, както е описано в диаграмите по-долу. Положителен първи скринингов тест (IF тест, PCR/FISH, селективна изолация) трябва да се потвърди от втори скринингов тест на базата на различен биологичен принцип.

Ако първият скринингов тест е положителен, тогава се предполага заразяване с *R. Solanacearum* и трябва да се направи втори скринингов тест. Ако вторият скринингов тест е положителен потвърдението се потвърждава (предполагано наличие) и тестването трябва да продължи по схемата. Ако вторият скринингов тест е отрицателен, се счита, че пробата не е заражена с *R. Solanacearum*.

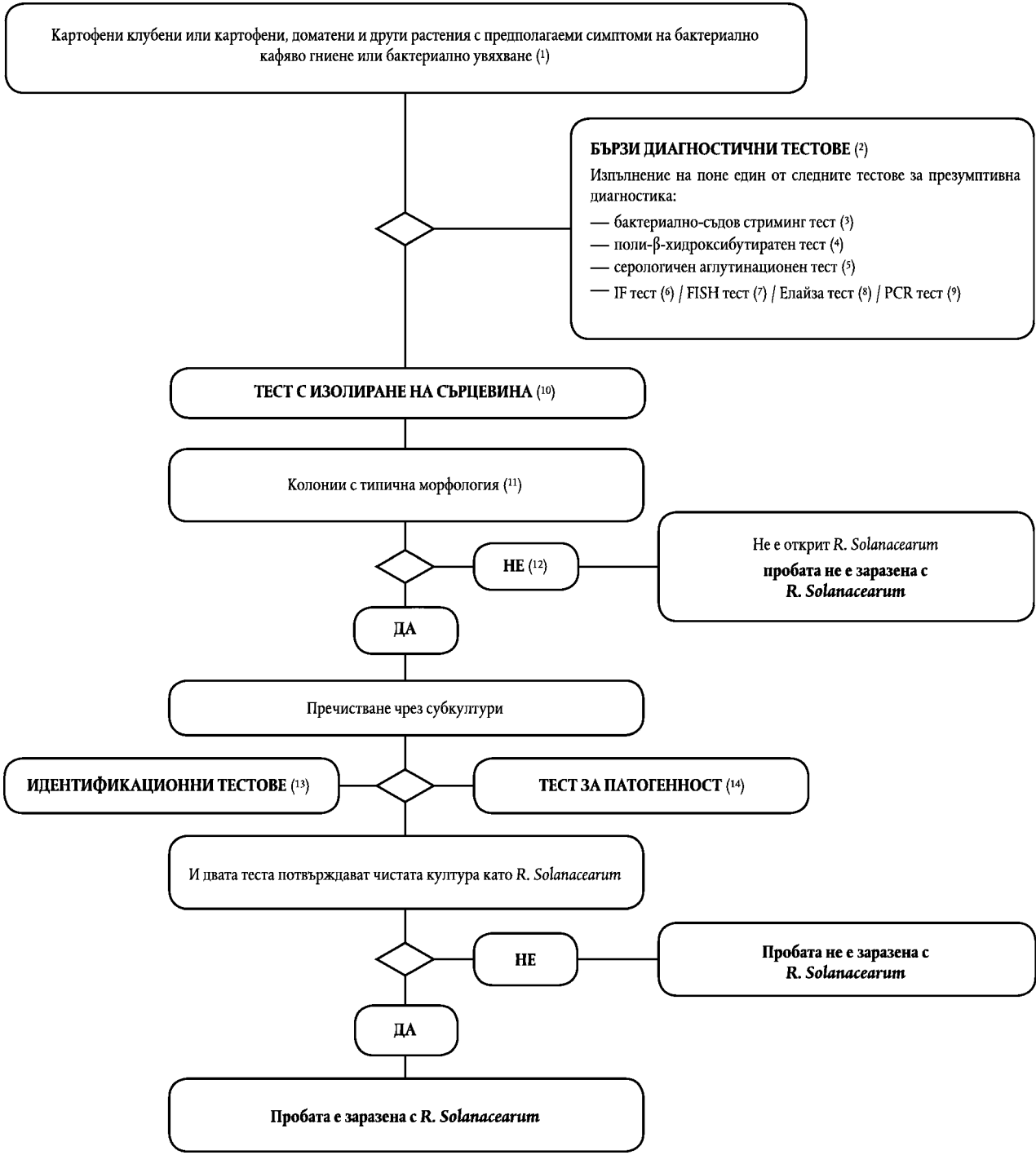
Потвърдено наличие, посочено в член 5, параграф 1 от Директива 98/57/ЕО, означава изолирането и определянето на чиста култура на *R. Solanacearum* с потвърждение за патогенност.

РАЗДЕЛ I

ПРИЛАГАНЕ НА ТЕСТОВАТА СХЕМА

- Схема за диагностициране за наличие на бактериално кафяво гниене по картофените клубени и бактериално увяхване при картофени, доматени и други растения гостоприемници със симптоми на бактериално кафяво гниене или бактериално увяхване.**

Тестовата процедура е предназначена за картофени клубени и растения с типични симптоми или симптоми за съмнение за наличие на кафяво гниене или везикуларно увяхване. Тя включва бърз скринингов тест, изолиране на патогенни от инфектираната везикуларна тъкан върху (селектирана) среда и, ако резултатът е положителен, определяне на културата като *Ralstonia solanacearum*.



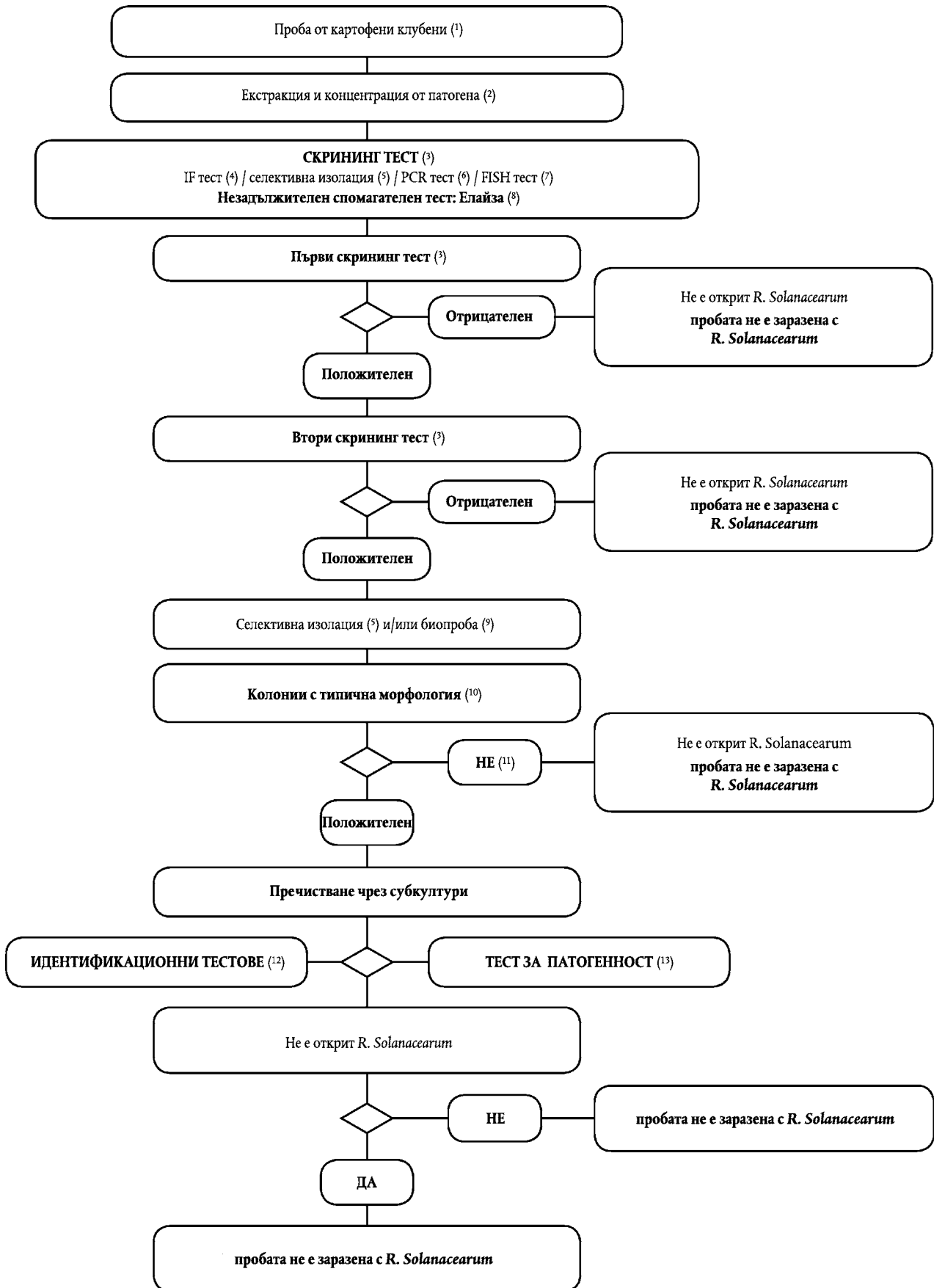
- (1) Описание на симптомите е дадено в раздел II, точка 1.
- (2) Бързите диагностични тестове улесняват вероятностното диагностициране, но не са съществени. Отрицателният резултат не винаги гарантира отсъствието на патоген.
- (3) Описание на стриминг тест за бактериален филтрат от съдова стеблена тъкан е дадено в раздел VI, точка А, точка 1.
- (4) Описание на тест за поли-β-хидроксибутиратни гранули в бактериални клетки е дадено в раздел VI, точка А, точка 2.
- (5) Описание на серологичен аглутинационен тест върху бактериален филтрат или екстракти от симптоматична тъкан е дадено в раздел VI, точка А, точка 3.
- (6) Описание на IF тест върху бактериален филтрат, суспендиран във вода или екстракти от симптоматична тъкан, е дадено в раздел VI, точка А, точка 5.
- (7) Описание на FISH тест върху бактериален филтрат, суспендиран във вода или екстракти от симптоматична тъкан, е дадено в раздел VI, точка А, точка 7.
- (8) Описание на Елайза тест върху бактериален филтрат, суспендиран във вода или екстракти от симптоматична тъкан, е дадено в раздел VI, точка А, точка 8.
- (9) Описание на PCR тест върху бактериален филтрат, суспендиран във вода или екстракти от симптоматична тъкан, е дадено в раздел VI, точка А, точка 6.
- (10) Патогенът обикновено се изолира лесно от симптоматичен растителен материал чрез разреждане в петра (раздел II, точка 3).
- (11) Описание на типична морфология на колония е дадено в раздел II, точка 3, буква г).
- (12) Култивирането може да не е успешно след напреднали стадии на инфекция поради конкуриране или неестествено бърз растеж на сапрофитни бактерии. Ако симптомите на заболяването са типични, но изолационният тест е отрицателен, тогава изолационното трябва да се повтори като се предпочитат използването на селективен тест в петра.
- (13) Надеждно определяне на чисти култури на преценолагаеми изолати на *R. Solanacearum* се постига, като се използват тестовете, описани в раздел VI, точка Б. Субспецифичното характеризирание не е задължително, но е препоръчително за всеки нов случай.
- (14) Описание на теста за патогенност е дадено в раздел VI, точка В.

2. **Схема за откриване и определяне на *R. Solanacearum* в проби от асимптоматични картофени клубени**

Принцип

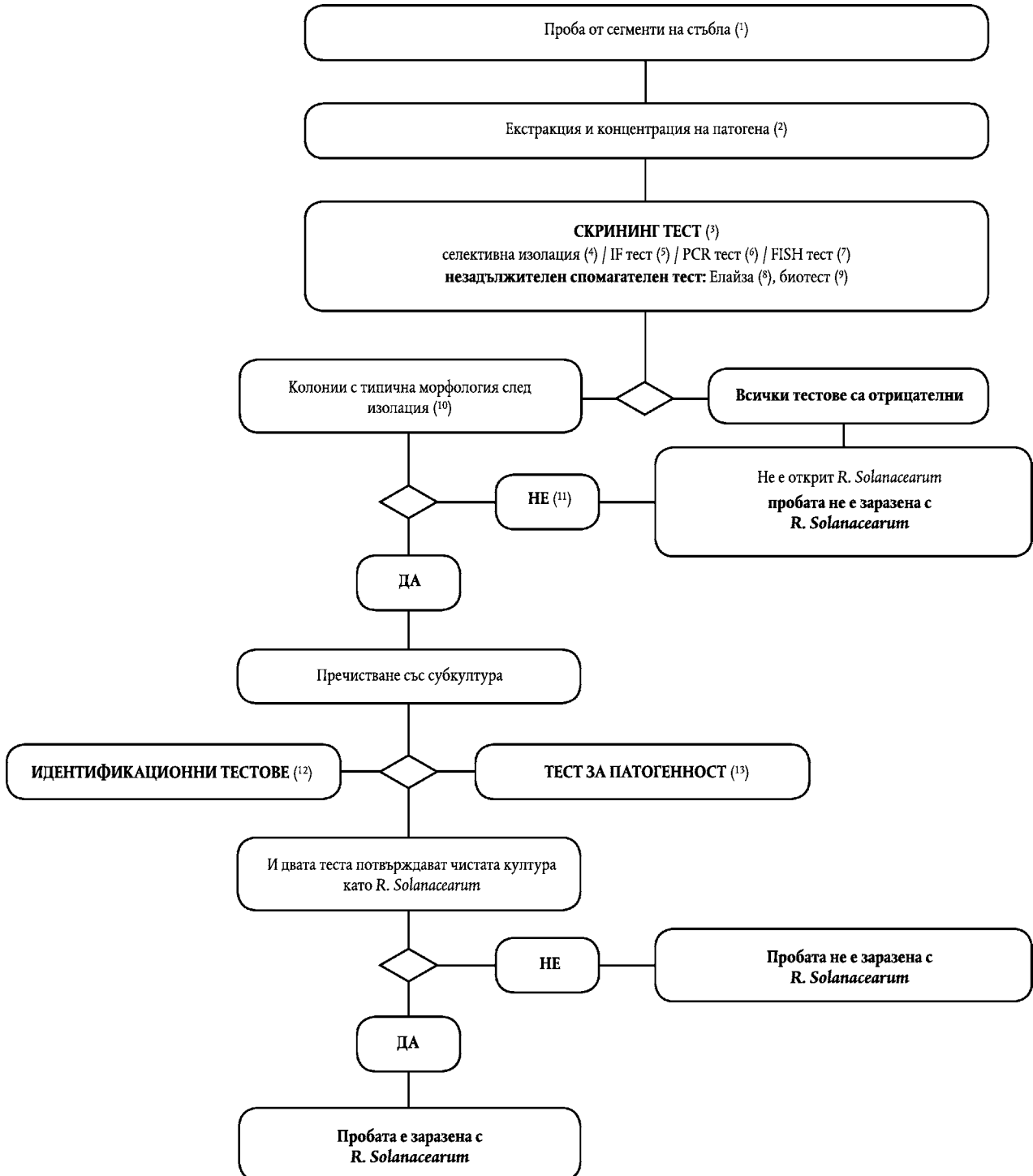
Тестовата процедура е предназначена за откриване на латентни инфекции в картофени клубени. Положителен резултат от поне два скринингови теста, на базата на различни биологични принципи, трябва да се допълни от изолирането на патогена; последвано, при изолирането на типични колонии, от потвърждаването на чиста култура като *R. Solanacearum*. Положителен резултат само от един от скрининговите тестове не е достатъчен, за да се счете пробата за съмнителна.

Скрининговите тестове и изолационните тестове трябва да позволяват откриване на 10^3 и 10^4 клетки/мл от повторно суспендирана пелета, включени като положителни контроли във всяка серия тестове.



- (1) Размерът на стандартната проба е 200 клубена, въпреки че процедурата може да се използва за по-малки проби, ако не са налице 200 клубена.
- (2) Описание на методите за екстракция и концентрация на е дадено в раздел III, точка 1.1.
- (3) Ако най-малко два теста, на базата на различни биологични принципи, са положителни, трябва да се направи екстракция и концентрация. Извършва се поне един скринингов тест. Когато той е отрицателен, се счита, че пробата е отрицателна. Когато той е положителен, трябва да се направи втори или няколко скринингови теста, на базата на различни биологични принципи, за да се потвърди първият положителен резултат. Ако вторият или другите тестове са отрицателни, се счита, че пробата е отрицателна. Не са необходими допълнителни тестове.
- (4) Описание на IF тест е дадено в раздел VI, точка А, точка 5.
- (5) Описание на теста за селективна изолация е дадено в раздел VI, точка А, точка 4.
- (6) Описание на PCR тестове е дадено в раздел VI, точка А, точка 6.
- (7) Описание на FISH тест е дадено в раздел VI, точка А, точка 7.
- (8) Описание на Елайза тестове е дадено в раздел VI, точка А, точка 8.
- (9) Описание на биологичната проба е дадено в раздел VI, точка А, точка 9.
- (10) Описание на типична морфология на колония е дадено в раздел II, точка 3, буква г).
- (11) Култивирането на биологични проби може да не е успешно поради конкуриране или инхибиране от сапрофитни бактерии. Ако в скрининговите тестове са получени ясни положителни резултати, но изолационните тестове са отрицателни, тогава изолационните тестове трябва да се повторят от същата пелета или като се вземе допълнително съдова тъкан близо до надебеления край от нарязани клубени от същата проба, а при необходимост се тестват и допълнителни проби.
- (12) Надежно определяне на чисти култури на предполагаеми изолати на *R. Solanacearum* се постига, като се използват тестове, описани в раздел VI, точка Б.
- (13) Описание на теста за патогенност е дадено в раздел VI, точка В.

3. Схема за откриване и определяне на *R. Solanacearum* в проби от асимптоматични, картофени, домати или други растения гостоприемници



- (1) Препоръчителният размер на пробата е даден в раздел III, точка 2.1.
- (2) Описание на методите за екстракция и концентрация на е дадено в раздел III, точка 2.1.
- (3) Ако най-малко два теста, на базата на различни биологични принципи, са положителни, трябва да се направи екстракция и концентрация. Извършва се поне един скринингов тест. Когато той е отрицателен се счита, че пробата е отрицателна. Когато той е положителен трябва да се направи втори или няколко скринингови теста, на базата на различни биологични принципи, за да се верифицира първия положителен резултат. Ако вторият или другите тестове са отрицателни се счита, че пробата е отрицателна. Не са необходими допълнителни тестове.
- (4) Описание на теста за селективна изолация е дадено в раздел VI, точка А, точка 4.
- (5) Описание на IF тест е дадено в раздел VI, точка А, точка 5.
- (6) Описание на PCR тестове е дадено в раздел VI, точка А, точка 6.
- (7) Описание на FISH тест е дадено в раздел VI, точка А, точка 7.
- (8) Описание на Елайза тестове е дадено в раздел VI, точка А, точка 8.
- (9) Описание на биологичната проба е дадено в раздел VI, точка А, точка 9.
- (10) Описание на типична морфология на колония е дадено в раздел II, точка 3, буква г).
- (11) Култивирането на биологични проби може да не е успешно поради конкуриране или инхибиране от сапрофитни бактерии. Ако в скрининговите тестове са получени положителни резултати, но изолационните тестове са отрицателни, изолационните тестове се повторят.
- (12) Надеждно определяне на чисти предполагаеми култури на *R. Solanacearum* се постига като се използват тестовете, описани в раздел VI, точка Б.
- (13) Описание на теста за патогенност е дадено в раздел VI, точка В.

РАЗДЕЛ II

ПОДРОБНИ МЕТОДИ ЗА ОТКРИВАНЕ И ОПРЕДЕЛЯНЕ НА R. SOLANACEARUM В КАРТОФЕНИ КЛУБЕНИ И КАРТОФЕНИ, ДОМАТЕНИ ИЛИ ДРУГИ РАСТЕНИЯ ГОСТОПРИЕМНИЦИ СЪС СИМПТОМИ НА БАКТЕРИАЛНО КАФЯВО ГНИЕНЕ ИЛИ БАКТЕРИАЛНО УВЯХВАНЕ

1. **Симптоми** (Виж интернет страница <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>)

1.1. Симптоми по картофите

Картофеното растение. Ранният стадий на инфекцията в полето се разпознава по увяхването на листата към върха на растението при високите температури през деня и възстановяване през нощта. При ранните стадии на повяхване листата се запазват зелени, но по-късно настъпва пожълтяване и кафява некроза. Появява се и епинастия. Повяхването на един стрък или на цели растения бързо става необратимо и води до падане и смърт на растението. Съдовата тъкан на напречно разрязани стебла на увехнали растения обикновено изглежда кафява и от разрязаната повърхност се отделя млечен бактериален филтрат или може да се отдели при стискане. Когато отрязаното стебло се постави вертикално във вода, от съдовите снопчета изтичат слизести нишки.

Картофеният клубен. Картофените клубени трябва да се разрежат напречно близо до надебеления край (при ластуна) или надлъжно по надебеления край с ластуна. Ранният стадий на инфекцията се разпознава по стъклено жълтото до светло кафяво обезцветяване на съдовия пръстен, от който след няколко минути спонтанно се появява бледокремав бактериален филтрат. По-късно съдовото обезцветяване става по-забележимо кафяво и некротата може да обхване и паренхимната тъкан. При напредналите стадии инфекцията се разпространява навън от надебеления край и очите, от които може да се отдели слизест бактериален филтрат, който предизвиква полепване на частици от почвата. Върху кората могат да се появят червеникаво-кафяви леко хлътнали увредени участъци поради вътрешно разпадане на съдова тъкан. Вторично развитие на гъбни и бактериални меки загнили участъци се среща често при напредналите стадии на болестта.

1.2. Симптоми по доматиите

Доматеното растение. Първият видим симптом е омекване на най-младите листа. При благоприятни за патогена условия на околната среда (почвени температури около 25 °C; наситена влажност) настъпва епинастия и увяхване на едната страна или на цялото растение в рамките на няколко дни, което води до пълно падане на растението. При по-неблагоприятни условия на околната среда (почвени температури под 21 °C) увяхването е по-малко, но могат да се развият голям брой външни корени върху стеблото. Възможно е да се наблюдават набраздявания, пълни с вода, от основата на стеблото, което свидетелства за некроза на съдовата тъкан. При напречно разрязване на стеблото от обезцветената кафява съдова тъкан се отделя бял или жълтеникав бактериален филтрат.

1.3. Симптоми по други гостоприемници

Растения на Solanum dulcamara и S. nigrum. При естествени условия рядко се наблюдават симптоми на увяхване при тези плевелни растения гостоприемници, освен ако температурите на почвата не надвишават 25 °C или нивата на инокулация са изключително високи (например когато *S. nigrum* расте в близост до заразени домати или картофени растения). При настъпване на увяхване симптомите са същите, както при доматиите. При неувяхващите растения на *Solanum dulcamara*, чиито стебла и корени растат във вода, може да се забележи вътрешно светлокафяво обезцветяване на съдовите тъкани при напречен разрез в основата на стеблото или частите на стеблото, които са под водата. От разрязаните съдови тъкани или от слизестите нишки, ако отрязаното стебло се постави вертикално във водата, може да изтече филтрат с бактерии дори при отсъствие на симптоми за увяхване.

2. **Бързи скринингови тестове**

Бързите скринингови тестове могат да улеснят диагностицирането на вероятна зараза, но не са съществени. Използват се един или няколко валидирани тестове от дадените по-долу:

2.1. Стриминг тест на стеблото

(виж раздел VI, точка A, точка 1)

2.2. Откриване на поли-β-хидроксibuтиратни (PHB) гранули

Характерни PHB гранули в клетките на *R. Solanacearum* се визуализират чрез оцветяване на топлинно фиксирано мазилно вещество от бактериален филтрат от заразен тъкан върху предметно стъкло с Nile Blue A или Sudan Black (виж раздел VI, точка A, точка 2).

2.3. Серологични аглутинационни тестове

(виж раздел VI, точка А, точка 3).

2.4. Други тестове

Други подходящи бързи скринингови тестове са IF тест (виж раздел VI, точка А, точка 5), FISH тест (виж раздел VI, точка А, точка 7), Елайза тестове (виж раздел VI, точка А, точка 8) и PCR тестове (виж раздел VI, точка А, точка 6).

3. Процедура за изолиране

- a) Филтрагът или участъци обезцветена тъкан от васкуларния пръстен в картофения клубен или от васкуларните клонки на стебла на картофени, домати или други увехнали растения гостоприемници се отстраняват. Суспендират се в малък обем стерилна дестилирана вода или 50mM фосфатен буфер (допълнение 4) и се оставят за 5 до 10 минути.
- b) Изготвя се серия десетични разреждания на суспензията.
- в) 50—100 µl от суспензията и разрежданията се прехвърлят в обща хранителна среда (NA, YPGA или SPA; виж допълнение 2) и/или тетразолиева среда на Келман (допълнение 2) и/или валидирана селективна среда (например SMSA; виж допълнение 2). Намазват се или се прави шрихово посяване с помощта на подходяща техника за разреждане в петра. Ако е целесъобразно се подготвят отделни петри с разреждана клетъчна суспензия на *R. Solanacearum* биовар 2 като положителна контрола.
- г) Петрите се инкубират за период от 2 до 6 дни при 28 °C.
 - Върху общата хранителна среда вирулентните изолати на *R. Solanacearum* развиват перлени кремаво-бели с неправилна форма флуидни колонии, често с характерно венче в центъра. Авирулентните форми на *R. Solanacearum* образуват малки, кръгли, нефлуидни, маслени колонии, които са изцяло кремаво-бели.
 - Върху тетразолиева среда на Келман и SMSA среда венчетата са с кървавочервен цвят. Авирулентните форми на *R. Solanacearum* образуват малки, кръгли, нефлуидни, маслени колонии, които са изцяло наситено червени.

4. Тестове за определяне на *R. Solanacearum*

Тестове за потвърждаване идентичността на вероятни изолати на *R. Solanacearum* са дадени в раздел VI, точка Б.

РАЗДЕЛ III

1. Подробни методи за откриване и определяне на *R. Solanacearum* в проби от асимптоматични картофени клубени

1.1. Изготвяне на проба

Забележка:

- Размерът на стандартната проба е 200 клубена за едно тестване. По-интензивното пробовземане изисква повече тестове върху проби с такъв размер. По-големият брой на клубените в пробата води до инхибиране или трудности при интерпретиране на резултатите. Но процедурата е удобна за използване при проби с по-малко от 200 клубена, когато наличните клубени не достигат.
- Потвърждаването на всички методи за откриване на наличие, описани по-долу, става на базата на тестване на проби от 200 клубени.
- Картофеният екстракт, описан по-долу, може също да се използва за откриване наличието на бактерията *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, причиняваща пръстеновидно гниене по картофите.

Незадължително предварително третиране преди изготвяне на пробата:

- a) Инкубация на пробите при 25 до 30 °C за период до две седмици преди тестването с цел насърчаване на мултиплицирането на евентуални популации на *R. Solanacearum*.
- б) Измиване на клубените. Използват се подходящи дезинфектанти (хлорни съединения, когато ще се използва PCR тест, за да се отстрани патогенната ДНК) и детергенти между всяка проба. Клубените се изсушават с въздух. Тази процедура за измиване е особено полезна (но не е задължителна) за силно замърсени с пръст проби или ако трябва да се направи PCR тест или процедура за пряка изолация.

- 1.1.1. Отстранява се с чист и дезинфекциран скалпел или нож за зеленчуци кората при надобеления край (с ластун) на всеки клубен, така че да се вижда съдовата тъкан. Внимателно се изрязва малка сърцевина от съдовата тъкан при надобеления край с минимално количество несъдова тъкан. (виж интернет страница <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Забележка: Отделят се всички (загнили) клубени с вероятни симптоми на кафяво гниене и се тестват отделно.

Ако при отстраняването на надобеления край се наблюдават симптоми на кафяво гниене в сърцевината, се прави визуална проверка на клубена и той се разрязва близо до надобеления край. Всеки разрязан клубен с вероятни симптоми трябва да се запази най-малко два дена при стайна температура, за да се създаде възможност за суберизация, и да се пази в хладилник (при температури от 4 до 10 °C) при подходящи карантинни условия. Всички клубени, включително тези с вероятни симптоми, се съхраняват в съответствие с изискванията на приложение III.

- 1.1.2. Събират се сърцевините от надобеления край в неизползвани контейнери за еднократна употреба, които могат да се затварят и/или запечатват (ако се използват повторно контейнерите, трябва да се почистят основно и да се дезинфекцират с хлорни съединения). Предпочита се сърцевините от надобеления край да се обработят незабавно. Когато това не е възможно, те се съхраняват в контейнер, без да се прибавя буфер, в хладилник за не повече от 72 часа или за 24 часа при стайна температура.

Надобеленият край и сърцевините се обработват с една от следните процедури:

- а) Сърцевините се покриват с достатъчно количество (около 40 ml) екстракционен буфер (допълнение 4) и се разбъркват с ротационен шейкър (50—100 грm) в продължение на 4 часа при температура под 24 °C или в продължение на 16 до 24 часа охладени,

или

- б) Сърцевините се хомогенизират с достатъчно количество (около 40 ml) екстракционен буфер (допълнение 4) или в блендер (например Waring или Ultra Thruax) или чрез трошене в запечатана торбичка за мацерация (например от усилен полиетилен Stomacher или Bioreba, 150 mm × 250 mm; стерилизирана чрез облъчване), като се използва гумен чук или подходящ апарат за мелене (например Nomex).

Забележка: При използване на блендер за хомогенизиране има голяма опасност от кръстосано заразяване на пробите. Необходимо е да се вземат предпазни мерки, за да се избегне създаването на аерозоли или разливане по време на процеса на екстракция. За всяка проба се осигуряват пряко стерилизирани ножове на блендера и съдове. Ако ще се използва PCR тест, избягвайте пренасянето на ДНК върху контейнерите и апаратите за мелене. Препоръчва се трошене в торбички за еднократна употреба и използването на еднократни тръби, когато ще се използва PCR.

- 1.1.3. Декантира се изплувалата на повърхността част. Ако мътноста е голяма, се налага избистряне чрез центрофугиране при ниска скорост (при не повече от 180 g за 10 минути при температура между 4 и 10 °C) или чрез вакуумна филтрация (40 до 100 µm), като филтърът се измива с допълнителен (около 10 ml) екстракционен буфер.

- 1.1.4. Сгъстява се бактериалната фракция чрез центрофугиране при 7000 g за 15 минути (или 10 000 g за 10 минути) при температура между 4 и 10 °C и се отстранява изплувалата на повърхността част, без да се нарушава пелетата.

- 1.1.5. Повторно се суспендира пелетата в 1,5 ml пелетен буфер (допълнение 4). Използват се 500 µl за тестване за *R. solanacearum*, 500 µl за *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* и 500 µl за сравняване. Добавя се стерилен глицерин към окончателната концентрация — 10 до 25 % (v/v) към 500 µl от референтната аликвотна част и към останалата аликвотна част за тестване, разбърква се и се оставя при температура от – 16 до – 24 °C (седмици) или от – 68 до – 86 °C (месеци). Аликвотните части за тестване се съхраняват при температура от 4 до 10 °C по време на тестването.

Не се препоръчва многократно замразяване и размразяване на пробите.

Ако се налага транспортиране на екстракта доставката се осигурява в охладена кутия в рамките на 24 до 48 часа.

- 1.1.6. Задължително е отделното третиране на всички *R. solanacearum* положителни контроли и проби, за да се избегне заразяване. Това се отнася за предметните стъкла за IF тест и за всички други тестове.

1.2. Тестване

Виж схемата и описанието на тестовете и оптимизираните протоколи в съответните допълнения:

Селективна изолация (виж раздел VI, точка А, точка 4)

IF тест (виж раздел VI, точка А, точка 5)

PCR тестове (виж раздел VI, точка А, точка 6)

FISH тест (виж раздел VI, точка А, точка 7)

Елайза тестове (виж раздел VI, точка А, точка 8)

Биологична проба (виж раздел VI, точка А, точка 9)

2. Подробни методи за откриване и определяне на *R. Solanacearum* в проби от асимптоматични картофени, домати или други растения

2.1. Изготвяне на проба

Забележка: За откриване на наличие на латентни популации на *R. Solanacearum* се препоръчва използването на съставни проби. Процедурата е удобна за използване при съставни проби от не повече от 200 стеблени части. Когато се правят изследвания, те трябва да се базират на статистическа представителна извадка на изследваната растителна популация.

2.1.1. Събиране на сегменти от стеблото с дължина от 1 до 2 cm в затворен стерилен контейнер в съответствие със следната процедура за пробонабиране:

Ранен долатен разсад: С чист дезинфекциран нож се отстранява сегмент с дължина 1 cm от основата на всяко стебло точно над нивото на почвата.

Поски или парникови домати растения: С чист дезинфекциран нож се отстранява най-ниското странично клонче на всяко растение, като се реже точно над връзката с главното стебло. Отстранява се сегмент с дължина 1 cm от най-долната част на всяко странично клонче.

Други гостоприемници: С чист дезинфекциран нож или градинарски ножици се отстранява сегмент с дължина 1 cm от основата на всяко стебло точно над нивото на почвата. При *S. dulcamara* или други растения гостоприемници, които виреят във вода, се отстраняват участъци с дължина 1—2 cm от частта на стеблото под водата или от ластуните, пуснали корени във водата.

Когато се прави пробонабиране от определено място, се препоръчва да се тества статистическа представителна извадка, съставена от най-малко 10 растения от всяко място на пробовземане за всеки потенциален плевелен гостоприемник. Откриването на наличие на патоген е най-надеждно през пролетта, лятото и есента, въпреки че естествените инфекции могат да се откриват през цялата година в многогодишното *Solanum dulcamara*, което расте в реките. Познатите гостоприемници включват саморасли картофени растения (задържащи почвата), *Solanum dulcamara*, *S. nigrum*, *Datura stramonium* и други представители на семейство *Solanaceae*. Други гостоприемници са *Pelargonium* spp. и *Portulaca oleracea*. Някои европейски плевелни spp., които потенциално могат да дават подслон на популации биовар 2/род 3 на *R. Solanacearum* в корени и/или ризосфери при специфични условия на околната среда, включват *Atriplex hastata*, *Bidens pilosa*, *Cerastium glomeratum*, *Chenopodium album*, *Eupatorium cannabinum*, *Galinsoga parviflora*, *Ranunculus scleratus*, *Rorippa* spp, *Rumex* spp., *Silene alba*, *S. nutans.*, *Tussilago farfara* и *Urtica dioica*.

Забележка: Визуалната проверка за откриване на вътрешни симптоми (съдово оцветяване или бактериален филтрат) може да се направи на този етап. Всички сегменти от стеблото със симптоми се отделят и се тестват отделно (виж раздел II).

2.1.2. Сегментите от стеблото за кратко време се дезинфекцират със 70 % етанол и веднага се подсушават върху салфетка. След това сегментите от стеблото се обработват с помощта на една от следните процедури:

а) Сегментите се покриват с достатъчно количество (около 40 ml) екстракционен буфер (допълнение 4) и се разбъркват с ротационен шейкър (50—100 грм) в продължение на четири часа при температура под 24 °C или в продължение на 16 до 24 часа охладени, или

б) Сегментите се обработват незабавно чрез трошене в здрава торбичка за мацерация (например Stomacher или Biogeba) с достатъчно количество екстракционен буфер (допълнение 4), като се използва гумен чук или подходящ апарат за мелене (например Homex). Ако това е невъзможно, сегментите от стеблото се съхраняват охладени не повече от 72 часа или не повече от 24 часа при стайна температура.

2.1.3. След 15 минути утаяване се декантира изплувалата на повърхността част.

2.1.4. Обикновено не се налага допълнително избистряне на екстракта или концентриране на бактериалната фракция, но може да се получат чрез филтриране и/или центрофугиране, описани в раздел III, точки 1.1.3—1.1.5.

2.1.5. Неразреденият или концентриран екстракт се разделя на две равни части. Едната част се поддържа при температура от 4 до 10 °C по време на тестването, а другата се съхранява с 10 до 25 % (v/v) стерилен глицерин — при температура от – 16 до – 24 °C (седмици) или от – 68 до – 86 °C (месеци) в случай, че се наложи допълнително тестване.

2.2. Тестване

Виж схемата и описанието на тестовете и оптимизираните протоколи в съответните допълнения:

Селективна изолация (виж раздел VI, точка А, точка 4)

IF тест (виж раздел VI, точка А, точка 5)

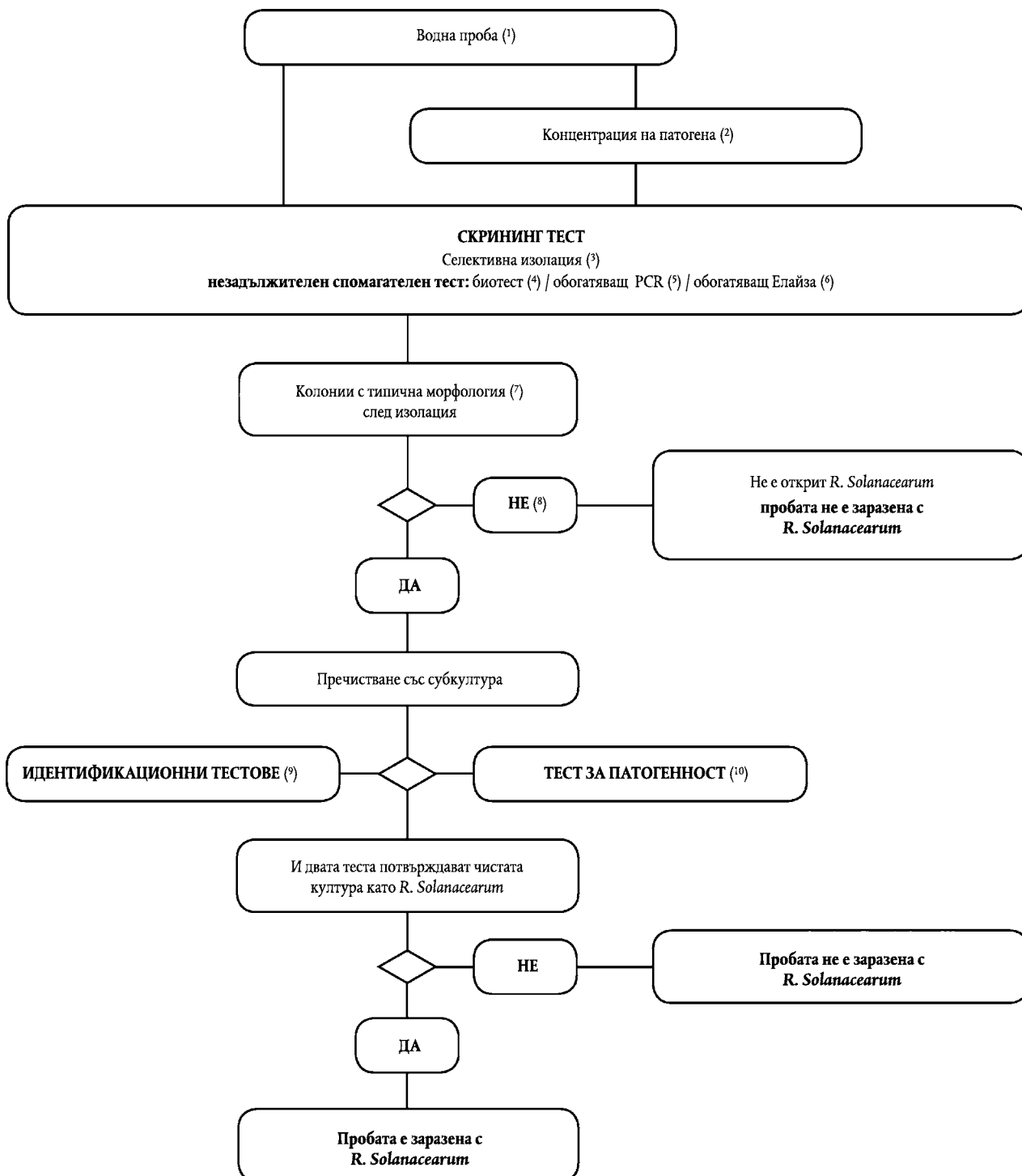
PCR тестове (виж раздел VI, точка А, точка 6)

FISH тест (виж раздел VI, точка А, точка 7)

Елайза тестове (виж раздел VI, точка А, точка 8)

Биологична проба (виж раздел VI, точка А, точка 9)

РАЗДЕЛ IV

1. Схема за откриване и определяне на *R. Solanacearum* във вода

- (1) Препоръчителните процедури за пробонабиране са дадени в раздел IV, точка 2.1.
- (2) Описание на методите за концентрация на патогена е дадено в раздел IV, точка 2.1. Концентрацията увеличава популациите както на патогена, така и на конкурентните сапрофитни бактерии и се препоръчва само ако не води до инхибиране на изолационния тест.
- (3) Описание на теста за селективна изолация е дадено в раздел VI, точка А, точка 4.
- (4) Описание на теста на биологична проба е дадено в раздел VI, точка А, точка 9.
- (5) Описание на PCR методи за обогатяване е дадено в раздел VI, точка А, точка 4.2 и раздел VI, точка А, точка 6.
- (6) Описание на Елайза методи за обогатяване е дадено в раздел VI, точка А, точка 4.2 и VI, точка А, точка 8.
- (7) Описание на типична морфология на колония е дадено в раздел II.3.г.
- (8) Култивирането може да не е успешно поради конкуриране или инхибиране от сапрофитни бактерии. Ако има вероятност големият брой сапрофитни популации да се отразят неблагоприятно на надеждността на изолацията, тестът за изолация се повтаря след разреждане на пробата в стерилна вода.
- (9) Надеждно определяне на чисти предполагаеми култури на *R. Solanacearum* се постига, като се използват тестовете, описани в раздел VI, точка Б.
- (10) Описание на теста за патогенност е дадено в раздел VI, точка В.

2. Методи за откриване и определяне на *R. Solanacearum* във вода

Принцип

Валидираната схема за откриване наличието на бактерията, описана в настоящия раздел, се прилага за откриване на патоген в проби от повърхностна вода и може също да се прилага за тестване на проби от води от преработка на картофи или отпадъчни води. Важно е, обаче, да се отбележи, че очакваната чувствителност на откриването на наличие се променя в зависимост от субстрата. Чувствителността на теста за изолация се влияе от популациите конкурентни сапрофитни бактерии, които по принцип са много повече във водите от преработка на картофи и в отпадъчните води, отколкото в повърхностните води. Въпреки че от схемата, дадена по-долу, се очаква да установи не по-малко от 10^3 клетки на литър в повърхностни води, чувствителността на откриването на наличие във водите от преработка на картофи и в отпадъчните води е значително по-ниска. Поради тази причина се препоръчва тестването на отпадъчни води да става след всяко третиране за пречистване, при което се редуцират популациите на сапрофитни бактерии. Ограниченията в чувствителността на тестовата схема трябва да се имат предвид, когато се оценява надеждността на получени отрицателни резултати. Въпреки че схемата се използва успешно при изследвания за определяне на наличие или отсъствие на патогена в повърхностни води, нейните ограничения трябва да се имат предвид, когато схемата се използва в подобни изследвания на води от преработка на картофи или отпадъчни води.

2.1. Изготвяне на проба

Забележка:

- Откриването на *R. Solanacearum* в повърхностни води е най-надеждно през пролетта, лятото и есента, когато температурата на водата надвишава 15 °C.
- Многократното пробонабиране по различно време през периода, упоменат по-горе, на определени места за пробовземане увеличава надеждността на откриването, като намалява последствията от промените в климата.
- Необходимо е да се вземе предвид въздействието на силните валежи и географията на реките, за да се избегнат последствията от продължително разреждане, които могат да замъглят наличието на патогена.
- Пробите от повърхностни води се вземат в близост до растенията гостоприемници, ако има такива.

2.1.1. На избраните за пробовземане места се събират проби чрез напълване на стерилни епруветки или бутилки на дълбочина по възможност под 30 cm и до 2 m от брега. За водите от преработка и отпадъчните води пробите се събират на мястото на заустване. Препоръчва се размерът на пробите за едно място на пробовземане да не надвишава 500 ml. Ако се предпочитат по-малки проби, се препоръчва пробовземането да стане поне на три пъти за всяко място на пробовземане, като всяка проба е съставена от две еднакви подпроби по 30 ml най-малко. При интензивни изследвания се избират поне три места на пробовземане през 3 km по речното течение, като се осигурява пробонабиране и от притоците, които се вливат в реката.

2.1.2. Пробите се транспортират на хладно и тъмно (4 до 10 °C) и се тестват в рамките на 24 часа.

2.1.3. При необходимост бактериалната фракция може да бъде концентрирана, като се използва един от следните методи:

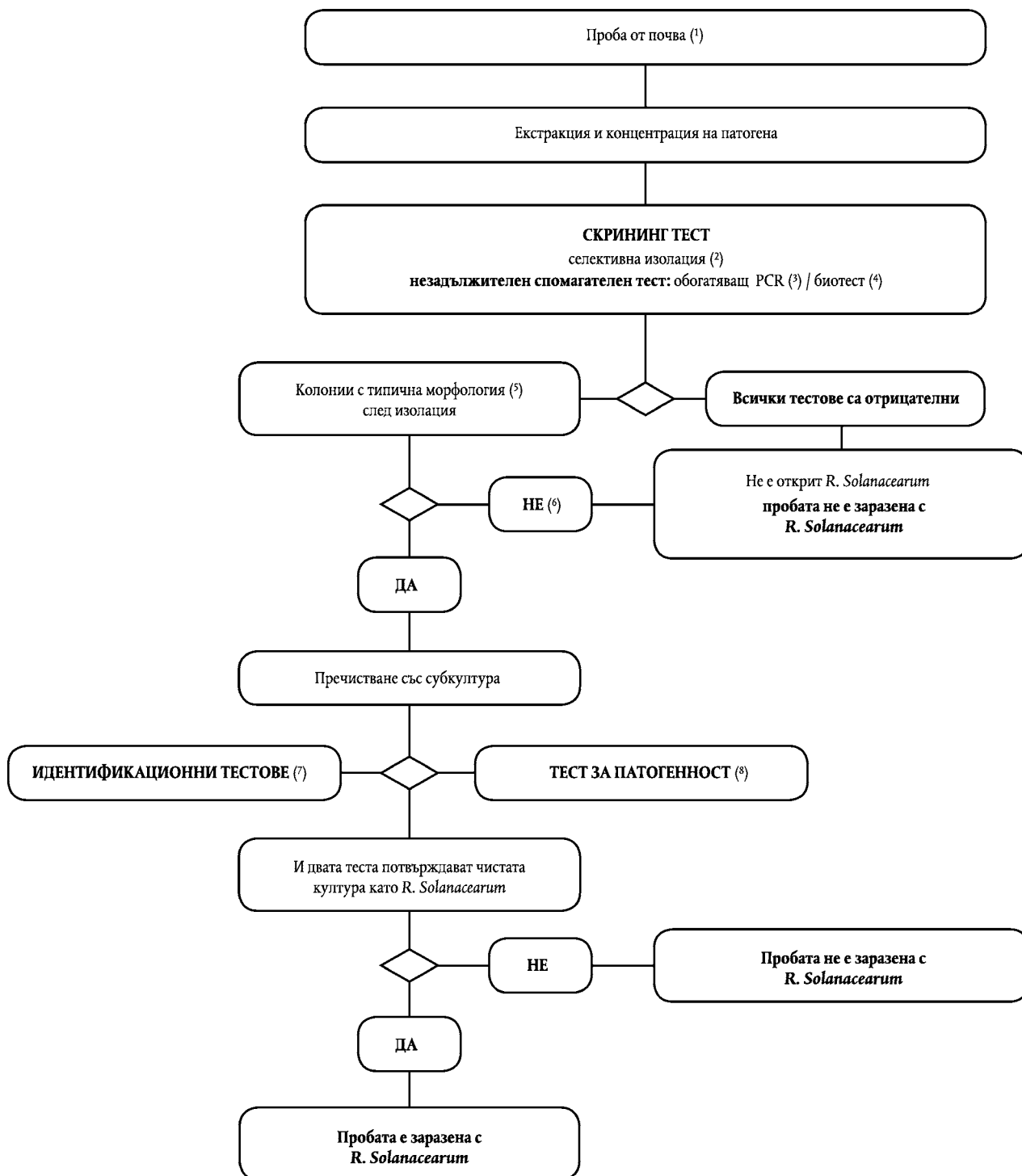
- a) 30 до 50 ml подпроби се центрофугират при 10 000 g за 10 минути (или 7000 g за 15 минути) за предпочитане при температури от 4 до 10 °C, отстранява се изплувалата на повърхността част и повторно се суспендира пелетата в 1 ml пелетен буфер (допълнение 4).
- b) Мембранна филтрация (минимален размер на порите 0,45 µm) последвана от измиване на филтъра в 5 до 10 ml пелетен буфер и запазване на отмитото. Този метод е подходящ за големи количества вода, съдържащи малък брой сапрофити.

Обикновено концентрацията не се препоръчва за проби от води от преработката на картофи или отпадъчни води откакто увеличената популация от конкурентни сапрофитни бактерии ще инхибира откриването на *Ralstonia solanacearum*.

2.2. Тестване

Виж схемата и описанието на тестовите в съответните допълнения.

РАЗДЕЛ V

1. Схема за откриване и определяне на *R. Solanacearum* в почва

- (¹) Препоръчителните процедури за пробонабиране са дадени в раздел V, точка 2.1.
- (²) Описание на теста за селективна изолация е дадено в раздел VI, точка А, точка 4.
- (³) Описание на PCR методи за обогатяване е дадено в раздел VI, точка А, точка 4.2 и раздел VI, точка А, точка 6.
- (⁴) Описание на теста на биологична проба е дадено в раздел VI, точка А, точка 9.
- (⁵) Описание на типична морфология на колония е дадено в раздел II, точка 3, буква г).
- (⁶) Култивирането може да не е успешно поради конкуриране или инхибиране от сапрофитни бактерии. Ако има вероятност големият брой сапрофитни популации да се отразят неблагоприятно на надеждността на изолацията, тестът за изолация се повтаря след разреждане на пробата в стерилна вода.
- (⁷) Надеждно определяне на чисти предполагаеми култури на *R. Solanacearum* се постига като се използват тестовете, описани в раздел VI, точка Б.
- (⁸) Описание на теста за патогенност е дадено в раздел VI, точка В.

2. Методи за откриване и определяне на *R. Solanacearum* в почва

Принципи

Схемата за потвърждаване на откриване на наличието на бактерията, описана в настоящия раздел, се прилага за откриване на патоген в проби от почва, но може също да се прилага за тестване на проби от твърди отпадъци от преработката на картофи или утайки от отпадъчни води. Но е необходимо да се отбележи, че тези методи не са достатъчно чувствителни, за да се гарантира откриване на малък брой и/или разпръснати популации на *R. Solanacearum*, които могат да се появят в естествено заразени проби на такива субстрати.

Ограниченията в чувствителността на тази тестова схема трябва да се имат предвид, когато се оценява надеждността на получени отрицателни резултати, а също и когато се използва в изследвания за определяне на наличие или отсъствие на патогена в почви или утайки. Най-надеждният тест за наличието на патогена в полски почви е да се засади възприемчив гостоприемник и да се наблюдава за поява на инфекция, но дори и при този метод може да убегне откриването на ниски нива на заразяване.

2.1. Изготвяне на проба

2.1.1. Пробонабирането от полска почва трябва да следва стандартните принципи, използвани за пробонабиране на нематоди. Събира се 0,5 до 1 kg почва за една проба от 60 места на 0,3 ha на дълбочина от 10 до 20 cm (или в мрежа 7 × 7 метра). Ако е налице съмнение за наличие на патогена броят на местата на пробовземане се увеличава до 120 на 0,3 ha. Пробите се държат на температура от 12 до 15 °C преди тестването. Пробонабирането за води от преработката на картофи и за отпадъчни води става чрез събиране на общо 1 kg от местата, което представлява общото количество утайка за тестване. Всяка проба се разбърква добре преди тестване.

2.1.2. Пробите от 10 до 25 g почва или утайка се диспергират чрез въртене и разклащане (250 rpm) в 60 до 150 ml буфер за екстракция (допълнение 4) в продължение на не повече от два часа. При необходимост диспергирането може да се улесни като се добави 0,02 % стерилен Tween-20 и 10 до 20 g стерилна баластра.

2.1.3. По време на тестване се поддържа температура на суспензията от 4 °C.

2.2. Тестване

Виж схемата и описанието на тестовете в съответните допълнения.

РАЗДЕЛ VI

ОПТИМИЗИРАНИ ПРОТОКОЛИ ЗА ОТКРИВАНЕ И ОПРЕДЕЛЯНЕ НА *R. SOLANACEARUM*

A. ТЕСТОВЕ ЗА ДИАГНОСТИЦИРАНЕ И ОТКРИВАНЕ

1. Стриминг тест на стеблото

Наличието на *R. Solanacearum* в стеблата на увехнали картофени, домати и други растения гостоприемници може да се установи с помощта на следното просто вероятностно тестване: Стеблото се отрязва точно над нивото на почвата. Отрязаната повърхност се потапя в епруетка с чиста вода. Наблюдава се дали след няколко минути от отрязаните съдови възелчета ще се появи характерно спонтанно изтичане на бактериални слизести нишки.

2. Откриване на поли-β-хидроксипутиратни гранули

1. Изготвя се мазилно вещество от бактериален филтрат от инфицирана тъкан или от 48-часова култура върху YPGA или SPA среда (допълнение 2) върху предметно стъкло.
2. За положителни контроли се изготвя мазилно вещество от шам на *R. Solanacearum* и ако се счита за полезно — мазилно вещество за отрицателна контрола на познат РНВ отрицателен sp.
3. Всяко предметно стъкло се изсушава на въздух и долната му повърхност се прекарва бързо над пламък за фиксиране на мазилното вещество.
4. Препаратът се оцветява с Nile Blue A или Sudan Black и се наблюдава под микроскоп, както е описано по-долу:

Тестване с Nile Blue A

- a) Всяко предметно стъкло обилно се залива с 1 % воден разтвор на Nile Blue A и се инкубира за 10 минути при 55 °C.
- b) Оцветеният разтвор се отцежда. Всяко предметно стъкло се измива внимателно на течаша вода. Излишната вода се отстранява със салфетка.
- в) Мазилното вещество обилно се залива с 8 % воден разтвор на оцетна киселина и се инкубира за 1 минута при стайна температура.
- г) Измива се за кратко време на леко течаша вода. Излишната вода се отстранява със салфетка.
- д) Навлажнява се отново с капка вода и се покрива с покривно стъкло.
- e) Оцветеното мазилно вещество се изследва с епифлуоресцентен микроскоп при 450 nm маслено потопяване с увеличение от 600 до 1000, като се използва маслено- или водопотопяем обектив.
- ж) Наблюдава се за ярко оранжева флуоресценция на РНВ гранули. Гранулите се наблюдават и при пропусната нормална светлина, за да се постигне увереност, че гранулите са вътрешноклетъчни и че клетъчната морфология е типична за *R. Solanacearum*.

Тестване със Sudan Black

- a) Всяко предметно стъкло обилно се залива с 0,3 % разтвор на Sudan Black В в 70 % етанол и се инкубира за 10 минути при стайна температура.
- b) Оцветеният разтвор се отцежда. Всяко предметно стъкло се измива внимателно на течаша вода, като излишната вода се отстранява със салфетка.
- в) За кратко време предметните стъкла се потапят в ксилол и се изсушават върху салфетка. *Внимание: Ксилолът е вреден, трябва да се вземат необходимите предпазни мерки и да се работи в стукателен шкаф за газове.*
- г) Предметните стъкла обилно се заливат с 0,5 % (w/v) воден разтвор на сафранин и се оставят за 10 секунди при стайна температура. *Внимание: Сафранинът е вреден, трябва да се вземат необходимите предпазни мерки и да се работи в стукателен шкаф за газове.*
- д) Измиват се за кратко време на леко течаша вода, подсушават се със салфетка и се покриват с покривно стъкло.
- e) Оцветеното мазилно вещество се изследва със светлинен микроскоп, който използва пропусната светлина при маслено потопяване с увеличение от 1000 като се използва масленопотопяем обектив.
- ж) Наблюдава се за синьо-черно оцветяване на РНВ гранули в клетки на *R. Solanacearum*, с оцветени в розово клетъчни стени.

3. Серологични аглутинационни тестове

Аглутинацията на клетки на *R. Solanacearum* в бактериален филтрат или симптоматични тъканни екстракти се наблюдава най-добре като се използват валидирани антитела (виж допълнение 3), етикетирани с маркери с подходящ цвят, например червено за клетки на *Staphylococcus aureus* или цветни латексови частици. Когато се използва комплект, закупен в търговската мрежа (виж допълнение 3), се спазват указанията на производителя. В противен случай се извършва следната процедура:

- a) Смесват се капки от суспензия на етиктирано антитяло и бактериален филтрат (приблизително 5 µm от всяко) върху прозорци на многогнездови тестателни предметни стъкла.
- b) Изготвят се положителни и отрицателни контроли като се използва суспензия на *R. Solanacearum* биовар 2 и хетероложен шам.
- в) Наблюдава се за аглутинация в положителни проби след внимателно разбъркване за 15 секунди.

4. Селективна изолация

4.1. Селективно посяване в петра

Забележка: Преди да се използва този метод за пръв път се извършват предварителни тестове, за да се гарантира възпроизводимо откриване на 10^3 до 10^4 единици, образуващи колонии, на *R. Solanacearum* на ml, добавени към екстракти от проби, които са дали отрицателен резултат при предишно тестване.

Използва се съответстващо валидирана селективна среда като например SMSA (модифицирана от Elphinstone *et al.*, 1996 г.; виж допълнение 2).

Изисква се внимание, за да се разграничи *R. Solanacearum* от други бактерии, които могат да развият колонии върху средата. Освен това колонии от *R. Solanacearum* могат да покажат атипична морфология, ако петрите са пренаселени или присъстват и антагонистични бактерии. Когато има съмнение за последиствия от конкуриране или антагонизъм, пробата следва да се тества повторно, като се използва друг вид тест.

Най-висока чувствителност на откриване чрез този метод може да се очаква, когато се използват пряно приготвени екстракти от проби. Но методът е приложим и към използването на екстракти, които са били съхранявани в глицерин при температура от -68 до -86 °C.

За положителни контроли се изготвят десетични разреждания от суспензия на 10^6 cfu на ml от вирулентен биовар 2 шам на *R. solanacearum* (например NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857). За да се избегне всяка възможност за заразяване, положителните контроли се изготвят напълно отделно от пробите за тестване.

За всяка новоизготвена партида селективна среда задължително се тества нейната пригодност за растеж на патогена, преди да се използва за тестване на рутинни проби.

Контролният материал се тества по същия начин както пробата/пробите.

4.1.1. Изпълнява се подходяща техника за селективно посяване в петра, чиято цел е да се гарантира отстраняването чрез разреждане на фоновите сапрофитни популации, образуващи колонии. Разпределят се 50—100 µl от екстракта от пробата на петра и на всяко разреждане.

4.1.2. Петрите се инкубират при 28 °C. Отчитането на петрите става след 48 часа, а след това ежедневно до 6 дни. Типичните *R. solanacearum* колонии върху SMSA среда са млечнобели, плоски, с неправилна форма и флуидни и след тридневна инкубация развият розово до кървавочервено оцветяване в центъра с вътрешно набраздяване или венче. (виж интернет страница <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Забележка: Върху тази среда понякога се образуват атипични колонии. Те може да са малки, кръгли, само червени на цвят и нефлуидни или само отчасти флуидни и затова трудно се различават от сапрофитните бактерии, образуващи колонии.

4.1.3. Вероятните колонии на *R. solanacearum* след щрихово посяване или разреждане в петра се пречистват върху обща хранителна среда, за да се получат изолирани колонии (виж допълнение 2).

4.1.4. Културите се съхраняват краткосрочно в стерилна вода (Ph от 6 до 8, без съдържание на хлор) при стайна температура на тъмно или дългосрочно в подходяща криозащитна среда при -68 до -86 °C или лиофилизирани.

4.1.5. Определят се вероятните култури (виж раздел VI, точка Б) и се извършва тест за патогенност (виж раздел VI, точка В).

Интерпретиране на резултатите от тестване на селективно посяване в петра

Тестването на селективно посяване в петра е отрицателно, ако не се наблюдават никакви бактериални колонии след шест дни или ако не са открити никакви вероятни колонии, типични за *R. solanacearum*, при условие че не се очаква вероятно инхибиране поради конкуриране или антагонизъм на други бактерии и са намерени типични *R. solanacearum* колонии в положителните контроли.

Тестването на селективно посяване е възможно, ако са изолирани вероятни *R. solanacearum* колонии.

4.2. Процедура на обогатяване

Използва се валидирана среда за обогатяване като например хранителна среда на Уйлбринк (виж допълнение 2).

Тази процедура може да се използва за селективно увеличаване на *R. solanacearum* популациите в екстрактите от проби и за увеличаване на чувствителността на откриването. Процедурата също така ефективно разрежда инхибиторите на PCR реакцията (1:100). Но следва да се обърне внимание, че обогатяването на *R. solanacearum* може да се провали поради конкурирането или антагонизма на сапрофитни организми, които често се обогатяват едновременно. Поради тази причина изолирането на *R. solanacearum* от обогатени хранителни култури може да се затрудни. Освен това, тъй като популациите на серологично свързани сапрофити могат да се увеличат, се препоръчва използването на специфични моноклонални антитела пред поликлоналните антитела, когато ще се използва Елайза тест.

- 4.2.1. За обогатяване чрез PCR 100 µl от екстракта от пробата се прехвърлят в 10 ml хранителна среда за обогатяване (виж допълнение 2), предварително разпределена в епруветки и колби без наличие на ДНК. За обогатяване чрез Елайза могат да се използват по-високи съотношения на екстракта към хранителната среда (например 100 µl в 1,0 ml хранителна среда за обогатяване).
- 4.2.2. Инкубира се за 72 часа при температура от 27 до 30 °C във вибрираща или в статична култура, като капачките не са плътно затворени, за да има възможност за аерация.
- 4.2.3. Разбърква се добре, преди да се използва в Елайза или PCR тестове.
- 4.2.4. Обогадената хранителна среда се третира по същия начин както пробата/пробите в тестовете по-горе.

Забележка: Ако се очаква инхибиране на обогатяването на *R. solanacearum* поради високи популации на някои конкурентни сапрофитни бактерии, обогатяването на екстрактите от пробите преди центрофугиране или други форми на концентрация може да даде по-добри резултати.

5. IF тест

Принцип

Използването на IF теста като основен скринингов тест е препоръчително поради доказаната му сила при постигане на задължителните прагове.

Когато IF тестът е използван като основен скринингов тест и отчитането по него е положително, като втори скринингов тест трябва да се направи изолационен тест, PCR тест или FISH тест. Когато IF тестът е използван като втори скринингов тест и отчитането по него е положително, за завършване на анализа е необходимо допълнително тестване в зависимост от схемата.

Забележка: Използва се валидиран източник на антигела на *R. solanacearum* (виж интернет страница <http://forum.euroora.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Препоръчва се за всяка нова партида антигела да се определи титърът. Титър е най-високото разреждане, при което се осъществява оптимална реакция при тестването на суспензия, съдържаща 10^5 до 10^6 клетки на ml от хомоложния шам на *R. solanacearum*, като се използва подходящо конюгатно съединение на флуоресцеин изотиоцианат (FITC) в съответствие с указанията на производителя. Всичките валидирани антисеруми са имали IF титър 1:2000. По време на тестването антигелата трябва да се използват при работно разреждане/работни разреждания, близки до или равни на титъра.

Тестването трябва да се извърши с прясно приготвени екстракти от проби. При необходимост то може успешно да се извърши с проби, съхранявани при температура от - 68 до - 86 °C в глицерин. Глицеринът може да се отстрани от пробата чрез добавяне на 1 ml пелетен буфер (допълнение 4), повторно центрофугиране за 15 минути при 7000 g и повторно суспендиране в равно количество пелетен буфер. Това не се налага често, особено ако пробите са фиксирани към предметните стъкла на пламък.

Подготвят се отделни предметни стъкла с положителни контроли на хомоложния шам или друг референтен шам на *R. solanacearum* и се потапят в картофен екстракт, определен в допълнение 3, точка Б, а по избор — в буфер.

При възможност трябва да се използва естествено заразена тъкан (запазена чрез лиофилизация или замразяване при температура от - 16 до - 24 °C) като подобна контрола върху предметните стъкла.

Като отрицателни контроли могат да се използват аликвоти от екстрактите от проби, които при предходно тестване са дали отрицателни резултати.

Стандартизираните положителни и отрицателни контролни материали, които могат да се използват с този тест, са изброени в допълнение 3.

Използват се многогнездови предметни стъкла на микроскоп, като се предпочитат тези с 10 прозорца с диаметър 6 mm всеки.

Контролният материал се тества по същия начин като пробата/пробите.

5.1. Тестателните предметни стъкла се изготвят, като се използва една от следните процедури:

- i) За пелети със сравнително малък скорбелен седимент:

С пипета се отмерва стандартно количество (15 µm е подходящо за прозорец с диаметър 6 mm — в мащаб се изчисляват количествата за по-големите прозорци) с разреждане 1/100 от повторно суспендираната картофена пелета върху първия прозорец. След това се отмерва с пипета сходно количество неразредена пелета (1/1) върху останалите прозорци в реда. Вторият ред може да се използва като дублиращ или за втора проба, както е показано във фигура 1.

ii) За други пелети:

Изготвят се десетични разреждания (1/10, 1/100) на повторно суспендираната пелета в пелетен буфер. С пипета се отмерва измерено стандартно количество (15 μm е подходящо за прозорец с диаметър 6 mm — в мащаб се изчисляват количествата за по-големите прозорци) от повторно суспендираната пелета и всяко разреждане върху реда от прозорци. Вторият ред може да се използва като дублиращ или за втора проба, както е показано във фигура 2.

5.2. Капчиците се изсушават при стайна температура или чрез затопляне до температури от 40 до 45 °C. Бактериалните клетки се фиксират върху предметното стъкло чрез загряване (15 минути при 60 °C), с помощта на пламък, с 95 % етанол или в съответствие с конкретните указания на доставчиците на антителата.

При необходимост фиксираните предметни стъкла могат да се съхраняват в замразено състояние в сушилна камера за необходимото време (не повече от три месеца), преди да бъдат подложени на тестване отново.

5.3. IF процедура

i) В съответствие с изготвянето на тестово предметно стъкло в точка 5.1, i):

Изготвя се набор от двойни разреждания. В първото гнездо се поставя $\frac{1}{2}$ от тигъра (T/2), а в другите — $\frac{1}{4}$ от тигъра (T/4), $\frac{1}{2}$ от тигъра (T/2), тигъра (T) и два пъти тигъра (2T).

ii) В съответствие с изготвянето на тестово предметно стъкло в точка 5.1, ii):

Изготвя се работното разреждане (WD) на антителото в IF буфер. Работното разреждане оказва въздействие върху спецификата.

Фигура 1. Приготвяне на тестово предметно стъкло в съответствие с точка 5.1, i) и точка 5.3, i)

		Разреждания на повторно суспендирана пелета							
		1/100	1/1	1/1	1/1	1/1	<input type="checkbox"/>	Разреждане на повторно суспендирана пелета	
		(T = тигър)	T/2	T/4	T/2	T	2T	<input type="checkbox"/>	Двойни разреждания на антисерума/антителото
Проба 1		● 1	● 2	● 3	● 4	● 5			
Дубликат на проба 1 или проба 2		● 6	● 7	● 8	● 9	● 10			

Фигура 2. Изготвянето на тестово предметно стъкло в съответствие с точка 5.1, ii) и точка 5.3, ii)

		Работно разреждане на антисерум/антитело						
		1/1	1/10	1/100	празно	празно	<input type="checkbox"/>	Десетично разреждане на повторно суспендирана пелета
Проба 1		● 1	● 2	● 3	● 4	● 5		
Дубликат на проба 1 или проба 2		● 6	● 7	● 8	● 9	● 10		

- 5.3.1. Предметните стъкла се подреждат върху влажна салфетка. Всеки тестов прозорец се покрива изцяло с разреденото антияло/антитела. Във всеки прозорец количеството на антиялото трябва да е най-малко равно на количеството на екстракта.

Когато не са дадени конкретни указания от доставчиците на антителата, се извършва следната процедура:

- 5.3.2. Предметните стъкла се инкубират покрити върху влажна хартия в продължение на 30 минути при стайна температура (от 18 до 25 °C).
- 5.3.3. От всяко предметно стъкло се изтръскват капчиците и внимателно се изплаква с IF буфер. Измива се чрез потапяне за пет минути в IF буфер-Tween (допълнение 4), а след това в IF буфер. Трябва да се внимава да не се образуват аерозоли или да се разпръснат капчици, което би довело до кръстосано заразяване. Излишната влага се отстранява чрез внимателно попиване.
- 5.3.4. Предметните стъкла се подреждат върху влажна салфетка. Тестовите прозорци се покриват с разредено FITC конюгатно съединение, използвано за определянето на титъра. Във всеки прозорец количеството на съединението трябва да е най-малко равно на количеството на антиялото.
- 5.3.5. Предметните стъкла се инкубират покрити върху влажна хартия в продължение на 30 минути при стайна температура (от 18 до 25 °C).
- 5.3.6. От всяко предметно стъкло се изтръскват капчиците. Изплаква се и се измива, както по-горе (5.3.3).

Излишната влага се отстранява внимателно.

- 5.3.7. С пипета се отмерват 5—10 µm от 0,1M фосфатен буферен глицерин (допълнение 4) или предпазашо от обезцветяване вещество, продавано в търговската мрежа, върху всеки прозорец и се покрива с хартия.

5.4. Отчитане на IF тест:

- 5.4.1. Тестовите предметни стъкла се изследват с епифлуоресцентен микроскоп с филтри, подходящи за възбуждане на FITC, потопени в масло или вода при увеличение 500—1000. Прозорците се сканират по дължината на двата диаметъра под прав ъгъл и по периметъра. За пробите, които не показват никакви клетки или малък брой клетки, се наблюдават поне 40 микроскопски полета.

Най-напред се проверява предметното стъкло с положителна контрола. Клетките трябва да се светли, флуоресцентни и напълно оцветени при определения титър за антияло или работно разреждане. Ако оцветяването е нетипично, IF тестът (раздел VI, точка A, точка 5) трябва да се повтори.

- 5.4.2. Тестателните прозорци на тестовите предметни стъкла се наблюдават за светли флуоресциращи клетки с характерната морфология на *R. solanacearum* (виж интернет страница <http://forum.euroa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Интензитетът на флуоресценцията трябва да е равен на положителното контролно оцветяване при същото разреждане на антителата. Клетките с непълно оцветяване или със слаба флуоресценция не се зачитат.

При съмнение за заразяване тестът трябва да се повтори. Това става, когато всички предметни стъкла в партидата показват положителни клетки поради заразяване на буфера или ако се открият положителни клетки (извън прозорците на предметните стъкла) върху покритието на предметните стъкла.

- 5.4.3. Няколко проблема са присъщи за спецификата на имунофлуоресцентния тест. В пелетите от картофена сърцевина откъм надебеления край и сегменти от стеблото могат да се появят фонові популации от флуоресциращи клетки с атипична морфология и сапрофитни бактерии с кръстосано действие, чиито размер и морфология са сходни до тези на *R. solanacearum*.
- 5.4.4. Разглеждат се само флуоресциращите клетки с типичен размер и морфология при титъра или работното разреждане на антителата в 5.3.

5.4.5. Интерпретиране на отчетените резултати от IF тест

- i) При откриване на светли флуоресциращите клетки с характерна морфология се определя средният брой на типични клетки за микроскопско поле и се изчислява броят на типичните клетки за ml повторно суспендирана пелета (допълнение 5).

Отчетените резултати от IF тест са положителни за пробите с поне 5×10^3 типични клетки за ml повторно суспендирана пелета.

- ii) Отчетените резултати от IF тест са отрицателни за пробите с по-малко от 5×10^3 типични клетки за ml повторно суспендирана пелета и пробата се счита за отрицателно. Не се налага допълнително тестване.

6. PCR тестове

Принципи

Когато PCR тест се използва като основен скринингов тест и резултатите от него са положителни, трябва да се направи изолационен или IF тест като втори задължителен скринингов тест. Когато PCR тест се използва като втори скринингов тест и резултатите от него са положителни, трябва да се направи допълнително тестване в съответствие със схемата, за да завърши диагностицирането.

Пълното използване на този метод като основен скринингов тест се препоръчва само когато са натрупани необходимите експертни знания и умения.

Забележка: Предварителното тестване с помощта на този метод трябва да позволява възпроизводимо откриване на 10^3 до 10^4 клетки на *R. solanacearum* на ml, добавени към екстракти от проби, които са дали отрицателни резултати при предишно тестване. За да се постигнат максимални нива на чувствителност и конкретност във всички лаборатории, може да се наложи експериментиране с цел оптимизиране на тестването.

Използват се валидирани PCR реагенти и протоколи (виж допълнение 6). По-добре е да се избере метод с вътрешна контрола.

Използват се подходящи предпазни мерки, за да се избегне заразяване на пробите с целева ДНК. За да се минимизира възможността за заразяване с целева ДНК, PCR тестът трябва да се провежда от опитни технически лица в специализирани лаборатории по молекулярна биология.

Отрицателните контроли (за екстракция на ДНК и за PCR процедури) винаги трябва да се обработват като окончателни проби в процедурата, за да стане ясно дали е настъпило пренасяне на ДНК.

В PCR теста трябва да се включат следните контроли:

- екстракт от проба, която е дала отрицателен резултат за *R. solanacearum* при предишно тестване,
- буферни контроли, използвани за екстракция на бактерията, и ДНК от пробата,
- микс за PCR реакция.

Включват се задължително следните положителни контроли:

- аликвоти на повторно суспендирани пелети, към които е добавена *R. solanacearum* (изготвяне виж в допълнение 3, точка Б),
- суспензия от 10^6 клетки на ml *R. solanacearum* във вода от вирулентен изолат (например NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; виж допълнение 3, точка Б),
- при възможност се използва също ДНК, екстрахирана от положителни контролни проби в PCR теста.

За да се избегне потенциално заразяване, положителните контроли се изготвят отделно от пробите за тестване.

Екстрактите от проби трябва по възможност да нямат замърсяване с почва. Затова в някои случаи се препоръчва да се изготвят екстракти от измити картофи, когато ще се използват PCR протоколи.

Стандартизираните положителни и отрицателни контролни материали, които могат да се използват с този тест, са изброени в допълнение 3.

6.1. Методи за почистване на ДНК

Използват се описаните по-горе положителни и отрицателни контролни проби (виж допълнение 3).

Контролният материал се тества по същия начин като пробата/пробите.

Съществуват голям брой методи за почистване на целева ДНК от сложни пробни субстрати, като се отстраняват инхибиторите на PCR и други ензимни реакции и се концентрира целева ДНК в екстракта от пробата. За използване с валидираните PCR методи, дадени в допълнение 6, е оптимизиран следният метод.

а) Метод на Пастрик (2000)

1. Отмерват се с пипета 220 µl лизисен буфер (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) в епруетка на Епендорф от 1,5 ml.
2. Добавят се 100 µl екстракт от пробата и се поставят в подгряващ блок или водна баня при 95 °C за 10 минути.
3. Остава се епруетката за 5 минути върху лед.
4. Добавят се 80 µl основен разтвор от лизозим (50 mg лизозим на ml в 10 mM Tris HCl, pH 8,0) и се инкубира при 37 °C за 30 минути.
5. Добавят се 220 µl Easy DNA® разтвор А (Invitrogen), разбърква се силно, докато преципитатът започне да се движи свободно в епруетката и пробата добива еднообразен вискозитет.
6. Добавят се 220 µl Easy DNA® разтвор В (Invitrogen), разбърква се силно, докато преципитатът започне да се движи свободно в епруетката и пробата добива еднообразен вискозитет.
7. Добавят се 500 µl хлороформ и се разбърква до намаляване на вискозитета и сместа става хомогенна.
8. Центрофугира се при 15 000 g за 20 минути при 4 °C за отделяне на фазите и създаване на фазова граница.
9. Горната фаза се прехвърля във неизползвана епруетка на Епендорф.
10. Добавя се 1 µl 100 % етанол (- 20 °C), разбърква се бързо и се инкубира върху лед за 10 минути.
11. Центрофугира се при 15 000 g за 20 минути при 4 °C и се отстранява етанолът от пелетата.
12. Добавят се 500 µl 80 % етанол (- 20 °C) и се разбърква чрез обръщане на епруетката.
13. Центрофугира се при 15 000 g за 10 минути при 4 °C, оставя се пелетата и се отстранява етанолът.
14. Остава се пелетата да изсъхне на въздух или в ДНК speed vac.
15. Суспендира се повторно пелетата в 100 µl стерилен UPW и се оставя при стайна температура най-малко за 20 минути.
16. Съхранява се при - 20 °C, докато потрѐбва за PCR.
17. Утаява се белият преципитат чрез центрофугиране и се използват 5 µl от изплувалата на повърхността част, съдържаща ДНК, за PCR.

б) Други методи

Могат да се използват и други методи за екстракция на ДНК например Qiagen DNeasy Plant Kit, при условие че са доказали, че са еднакво ефективни при почистване на ДНК от контролни проби, съдържащи от 10³ до 10⁴ патогенни клетки на µl.

- 6.2. PCR
- 6.2.1. Изготвят се тестателни и контролни темплети за PCR в съответствие с валидираните протоколи (раздел VI, точка А, точка 6). Изготвя се едно десетично разреждане на пробен ДНК екстракт (1:10 в UPW).
- 6.2.2. Изготвя се подходящ микс за PCR реакция в среда без заразяване в съответствие с публикуваните протоколи (допълнение 6). При възможност се препоръчва да се използва съставен PCR протокол, който включва и вътрешна PCR контрола.
- 6.2.3. Добавят се 2—5 µl ДНК екстракт на 25 µl PCR реакция в стерилни PCR епруветки в съответствие с PCR протоколите (виж допълнение 6).
- 6.2.4. Включете отрицателна контролна проба, съдържаща само микс за PCR реакция, и добавете същият източник на UPW, който е използван в PCR сместа вместо пробата.
- 6.2.5. Епруветките се поставят в същото термоциклично устройство, което е използвано при предварителното тестване и се изпълнява подходящо оптимизирана PCR програма (допълнение 6).
- 6.3. Анализ на PCR продукт
- 6.3.1. PCR ампликоните се разделят чрез агарозна гел електрофореза. Пуска се поне 12 µl амплифициран микс за ДНК реакция от всяка проба, смесена с 3 µl пълнителен буфер (допълнение 6) в 2,0 % (w/v) агарозни гелове в трис-ацетат-EDTA (TAE) буфер (допълнение 6) при 5—8 V за cm. Използва се подходящ ДНК маркер например 100 bp ladder (набор от ДНК фрагменти с фиксирана дължина).
- 6.3.2. Разкриват се ДНК веригите чрез оцветяване в етидиев бромид (0,5 mg на l) за 30 до 60 минути като се вземат необходимите предпазни мерки за работа с този мутаген.
- 6.3.3. Наблюдава се оцветеният гел при късовълнова UV трансилуминация ($\lambda = 302 \text{ nm}$) за амплифицирани PCR продукти с очаквания размер (допълнение 6) и се документира.
- 6.3.4. За всички нови констатации/случаи се прави проверка на автентичността на PCR ампликона чрез извършване на ограничителен ензимен анализ върху проба от останалата амплифицирана ДНК, като се инкубира при оптимална температура и време с подходящ ензим и буфер (виж допълнение 6). Стабилизирани фрагменти се отделят чрез агарозна гел електрофореза, както е описано по-горе, и се следи за поява на характерно рестрикционно фрагментиране при UV трансилуминация след оцветяване с етидиев бромид и се сравнява с нестабилизираната и стабилизираната положителна контрола.

Интерпретиране на резултатите от PCR тест:

PCR тестът е отрицателен, ако за въпросната проба не е установен *R. Solanacearum* специфичен ампликон с очакван размер, но е установен за всички положителни контролни проби (в случай на съставна PCR със специфични за растението вътрешни контролни праймери: втори PCR продукт с очакван размер трябва да се амплифицира с въпросната проба).

PCR тестът е положителен, ако е установен *R. Solanacearum* специфичен PCR ампликон с очакван размер и е установен ограничителен модел (при необходимост), при условие че той не е амплифициран от никоя отрицателна контролна проба. Надеждно потвърждаване на положителен резултат може също да се получи, като се повтори теста с втори набор от PCR праймери (допълнение 6).

Забележка: Може да има съмнение за инхибиране на PCR, ако очакваният ампликон е получен от положителната контролна проба, съдържаща *R. Solanacearum* във вода, но отрицателните резултати се получават от положителни контроли с *R. Solanacearum* в картофен екстракт. В съставните PCR протоколи с вътрешни PCR контроли инхибиране на реакцията се отбелязва, когато не е получен нито един от двата ампликона.

Може да има съмнение за заразяване, ако очакваният ампликон е получен от една или няколко отрицателни контроли.

7. FISH тест

Принцип

Когато FISH тест се използва като първи скринингов тест и резултатите от него са положителни, трябва да се направи изолационен или IF тест като втори задължителен скринингов тест. Когато FISH тест се използва като втори скринингов тест и резултатите от него са положителни, трябва да се направи допълнително тестване в съответствие със схемата, за да завърши диагностицирането.

Забележка: Използват се валидирани специфични за *R. solanacearum* олигопроби. Предварителното тестване с помощта на този метод трябва да позволява възпроизводимо откриване на 10^3 до 10^4 клетки на *R. solanacearum* на ml, добавени към екстракти от проби, които са дали отрицателни резултати при предишно тестване.

Следната процедура се препоръчва да се извърши с прясно приготвен екстракт от проби, но може успешно да се извърши с екстракт от проби, съхраняван в глицерин при температура от -16 до -24 °C и от -68 до -86 °C.

За отрицателни контроли се използват аликвоти на екстракт от проби, които са дали отрицателни резултати за *R. solanacearum* при предишни изследвания.

За положителни контроли се използват суспензии, съдържащи от 10^5 до 10^6 клетки на ml *R. Solanacearum* биовар 2 (например шам NCPRB 4156 = PD 2762 = CFBR 3857, виж допълнение 3) в 0,01M фосфатен буфер (PB) от 3- до 5-дневна култура). Отделно се изготвят предметни стъкла с положителни контроли от хомоложния шам или друг референтен шам на *R. Solanacearum*, потопени в картофен екстракт, определени в допълнение 3, точка Б.

Използването на FITC-етикетирана еубактериална олигопроба предлага контрола за процеса на хибридизация, тъй като тя ще оцвети всички еубактерии, които се намират в пробата.

Стандартизираните положителни и отрицателни контролни материали, които могат да се използват с този тест, са изброени в допълнение 3, точка А.

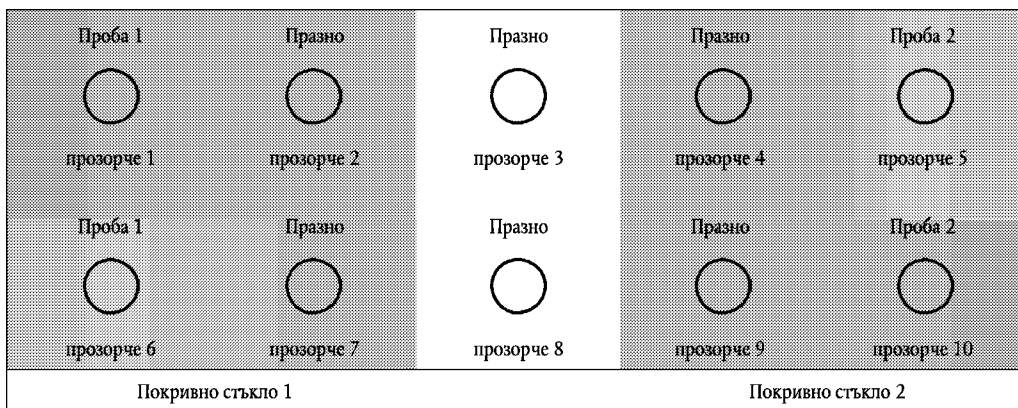
Контролният материал се тества по същия начин като пробата/пробите.

7.1. Фиксиране на картофен екстракт

Следващият протокол е на базата на Wullings *et al.* (1998):

- 7.1.1. Изготвя се фиксиращ разтвор (виж допълнение 7).
- 7.1.2. Отмерват се с пипета 100 µl от всеки екстракт в епруветка на Епендорф и се центрофугира за 7 минути при 7000 g.
- 7.1.3. Отстранява се изплувалата на повърхността част и pelletata се разтваря в 200 µl от фиксиращия разтвор, изготвен < 24 часа предварително. Разбърква се и се инкубира за един час в хладилник.
- 7.1.4. Центрофугира се за 7 минути при 7000 g, отстранява се изплувалата на повърхността част и pelletata се разтваря в 75 µl 0,01M PB (виж допълнение 7).
- 7.1.5. Капват се 16 µl от фиксиращата суспензия върху чисто предметно стъкло, предназначено за множество тестове, както е показано на фиг. 7.1. На всяко стъкло се слагат две различни проби, неразредени, и се използват 10 µl за разреждане 1:100 (в 0,01M PB). Останалият разтвор от пробата (49 µl) може да се съхрани при -20 °C след добавяне на 1 обем 96 % етанол. Ако е необходимо да се повтори FISH тестът, етанолът се отстранява чрез центрофугиране и се добавя равен обем 0,01 PB (размесен чрез разбъркване).

Фигура 7.1 Схема на разположение на предметно стъкло за FISH тест



- 7.1.6. Предметните стъкла се изсушават на въздух (или в сушилни за предметните стъкла при 37 °C) и се фиксират на пламък.
- На този етап процедурата може да се прекъсне и да се продължи с хибридизацията на другия ден. Предметните стъкла се съхраняват обезпрашени и сухи на стайна температура.
- 7.2. Хибридизация
- 7.2.1. Клетките се дехидрират, като всяко предметно стъкло се поставя за 1 минута в етанолова серия с нарастващ процент — 50 %, 80 % и 96 %. Предметните стъкла се изсушават на въздух, поставени в държател.
- 7.2.2. Приготвя се влажна инкубационна камера, като дъното на херметизирана кутия се покрива със салфетка или филтърна хартия, напоена с 1x hybridmix (допълнение 7). Кутията се инкубира предварително в хибридизационна пещ.
- 7.2.3. Разпределят се 10 µl от хибридизационния разтвор (допълнение 7) в 8 прозорца (прозорци 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 и 10; виж фиг. 7.1) върху всяко предметно стъкло, като двата централни прозорца (3 и 8) се оставят празни.
- 7.2.4. Върху първите и последните четири прозорца се поставят покривни стъкла (24 × 24 mm) без изпускане на въздуха. Предметните стъкла се поставят в предварително затоплената влажна камера и се хибридизират за пет часа в пещта при 45 °C на тъмно.
- 7.2.5. Изготвят се три химични чаши, съдържащи 1 l Milli Q (молекулярна степен), 1 l 1x hybridmix (334 ml 3x hybridmix и 666 ml Milli Q вода) и 1 l 1/8x hybridmix (42 ml 3x hybridmix и 958 ml Milli Q вода). Всяка чаша предварително се инкубира във водна баня при 45 °C.
- 7.2.6. Отстраняват се покривните стъкла от предметните стъкла и последните се поставят в държател.
- 7.2.7. Отмива се излишната проба чрез инкубиране за 15 минути в химичната чаша с 1x hybridmix при 45 °C.
- 7.2.8. Държателят се поставя в 1/8 hybridmix миеш разтвор и се инкубира за още 15 минути.
- 7.2.9. Предметните стъкла се потапят за кратко време в Milli Q вода и се поставят върху филтърна хартия. Отстранява се излишната вода чрез внимателно покриване на повърхността с филтърна хартия. Отмерват се с пилета 5—10 ml предпазващ от обезцветяване клей (например Vectashield, Vecta Laboratories, Калифорния, САЩ или равностоен) и върху цялото предметно стъкло се поставя голямо покривно стъкло (24 × 60 mm).
- 7.3. Отчитане на резултатите от FISH тест
- 7.3.1. Предметните стъкла незабавно се подлагат на наблюдение с микроскоп, пригоден за епифлуоресцентна микроскопия с увеличение от 630 или 1000 с маслено потапяне. С филтър, подходящ за флуоресцентен изоцианат (FITC), еубактериалните клетки (включително и повечето грам отрицателни клетки) в пробата се оцветяват в флуоресцентно зелено. При използването на филтър за тетраметилпродамин-5-изотиоцианат Су3-оцветените клетки на *R. Solanacearum* изглеждат оцветени в флуоресциращо червено. Сравнява се морфологията на клетките с тази на положителните контроли. Клетките трябва да са светли, флуоресциращи и напълно оцветени. Ако оцветяването е нетипично, FISH тестът (раздел VI, точка A, точка 7) трябва да се повтори. Прозорците се сканират по дължината на двата диаметра под прав ъгъл и по периметъра. За пробите, които не показват никакви клетки или малък брой клетки, се наблюдават поне 40 микроскопски полета.
- 7.3.2. Тестовите прозорци на тестовите предметни стъкла се наблюдават за светли флуоресциращи клетки с характерната морфология на *R. solanacearum* (виж интернет страница <http://forum.eurogora.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Интензитетът на флуоресценцията трябва да е равен или по-силен. Клетките с непълно оцветяване или със слаба флуоресценция не се зачитат.
- 7.3.3. При съмнение за заразяване тестът трябва да се повтори. Това става, когато всички предметни стъкла в партидата показват положителни клетки поради заразяване на буфера или ако се открият положителни клетки (извън прозорците на предметните стъкла) върху покритието на предметните стъкла.

- 7.3.4. Няколко проблема са присъщи за спецификата на FISH теста. В пелетите от картофена сърцевина откъм надебеления край и сегменти от стеблото могат да се появят фонови популации от флуоресциращи клетки с атипична морфология и сапрофитни бактерии с кръстосано действие, чиито размер и морфология са сходни до тези на *R. solanacearum*.
- 7.3.5. Разглеждат се само флуоресциращите клетки с типичен размер и морфология.
- 7.3.6. Интерпретиране на резултата от FISH тест:
- i) Валидни резултати от FISH тест се получават, когато се наблюдават яркозелени флуоресциращите клетки с размер и морфология, типични за *R. Solanacearum*, когато се използва FITC филтър, и яркочервени флуоресциращите клетки, когато се използва родаминов филтър, във всички положителни контроли и нито в една отрицателна контрола. При откриване на светли флуоресциращи клетки с характерна морфология се определя средният брой на типични клетки за микроскопско поле и се изчислява броят на типичните клетки за ml повторно суспендирана пелета (допълнение 4). Пробите с поне 5×10^3 типични клетки за ml повторно суспендирана пелета се считат за потенциално заразени. Налага се допълнително тестване. Пробите с по-малко от 5×10^3 типични клетки за ml повторно суспендирана пелета се считат за отрицателни.
 - ii) FISH тестът е отрицателен, не се наблюдават яркочервени флуоресциращи клетки с размер и морфология, типични за *R. Solanacearum*, когато се използва родаминов филтър, при условие че се наблюдават типични яркочервени флуоресциращите клетки в положителните контролни препарати, когато се използва родаминов филтър.

8. Елайза тестове

Принцип

Поради сравнително ниската чувствителност на Елайза този тест може да се използва само като незадължителен допълнителен тест към IF, PCR и FISH. Когато се използва DAS Елайза, задължително се прави обогатяване и се използват моноклонални антитела (виж интернет страница <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Обогатяването на пробите преди да се използва Елайза може да е полезно като начин за увеличаване на чувствителността на теста, но може да се провали поради конкуриране от страна на други организми в пробата.

Забележка: Използва се валидиран източник на антитела на *R. solanacearum* (виж интернет страница <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Препоръчва се за всяка нова партида антитела да се определи титърът. Титър е най-високото разреждане, при което се осъществява оптимална реакция при тестването на суспензия, съдържаща 10^5 до 10^6 клетки на ml от хомоложния шам на *R. solanacearum*, като се използват подходящи конюгатни съединение на вторични антитела в съответствие с указанията на производителя. По време на тестването антителата трябва да се използват при работно разреждане, близко до или равно на титъра на търговската рецептура.

Определя се титърът на антителата върху суспензия, съдържаща 10^5 до 10^6 клетки на ml от хомоложния шам на *R. solanacearum*.

Включва се екстракт от проби, които са дали отрицателен резултат за *R. solanacearum* при предишно тестване, и суспензия на бактерия без кръстосано действие във фосфатен буферен физиологичен разтвор (PBS) като отрицателни контроли.

Като положителни контроли се използват аликвоти от екстракт от проби, които при предходно тестване са дали отрицателни резултати, смесени с 10^3 до 10^8 клетки на ml *R. Solanacearum* биовар 2 (например шам NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857, виж допълнение 2, точки А и Б). За сравняване на резултатите във всяка петра се използва стандартна суспензия, съдържаща 10^5 до 10^6 клетки на ml в PBS на *R. Solanacearum*. Осигурява се отделяне на положителните контроли върху микротитърната петра от пробата/пробите за тестване.

Стандартизираните положителни и отрицателни контролни материали, които могат да се използват с този тест, са изброени в допълнение 3, точка А.

Контролният материал се тества по същия начин както пробата/пробите.

Потвърдени са два Елайза протокола.

а) Индиректен Елайза (Robinson Smith *et al.*, 1995)

1. Използват се 100 до 200 μ m аликвоти от екстракт от проби. (Загриването при 100 °C за четири минути във водна баня или загряващ блок може да намали неспецифичните резултати в някои случаи).
2. Добавя се равен обем покривен буфер с двойна сила (допълнение 4) и се разбърква.
3. Добавят се 100 μ m аликвоти към поне две гнезда на микротитърната петра (например Nunc-Polysoгр или еквивалентна) и се инкубира за един час при 37 °C или за едно денонощие — при 4 °C.

4. Екстрактите се изваждат от гнездата. Гнездата се измиват трикратно с PBS-Tween (допълнение 4), като последният промивен разтвор се оставя да престои в гнездата най-малко пет минути.
5. Изготвя се подходящо разреждане на антитела към *R. Solanacearum* в блокиращ буфер (допълнение 4). За валидираните търговски антитела се използват препоръчаните разреждания (обикновено два пъти по-концентрирани от титъра).
6. Добавя се 100 μm във всяко гнездо и се инкубира за един час при 37 °C.
7. Изважда се разтворът с антитела от гнездата и се измива като преди (4).
8. Изготвя се подходящо разреждане на вторичното конюгатно антитяло от алкална фосфатаза в блокиращ буфер. Добавят се 100 μm във всяко гнездо и се инкубира за един час при 37 °C.
9. Изважда се конюгираното антитяло от гнездата и се измива както преди (4).
10. Добавят се 100 μm алкален фосфатазен субстратен разтвор (допълнение 4) към всяко гнездо. Инкубира се на тъмно при стайна температура и се отчита абсорбция при 405 nm на равни интервали в рамките на 90 минути.

б) DASI Елайза

1. Изготвя се подходящо разреждане на противо-*R. Solanacearum* поликлонални имуноглобулини в покривен буфер pH 9,6 (допълнение 4). Добавя се към всяко гнездо. Инкубира при 37 °C за четири до пет часа или при 4 °C — за 16 часа.
2. Гнездата се измиват трикратно с PBS-Tween (допълнение 4).

Добавят се 190 μm екстракт в най-малко две от гнездата. Добавят се и положителни и отрицателни контроли — всяка в две гнезда за всяка петра. Инкубира се за 16 часа при 4 °C.
3. Гнездата се измиват трикратно с PBS-Tween (допълнение 4).
4. Изготвя се подходящо разреждане на специфични за *R. Solanacearum* моноклонални антитела в PBS (допълнение 4), съдържащи също 0,5 % говежди серумен албумин (BSA) и се добавят 190 μm във всяко гнездо. Инкубира се при 37 °C за два часа.
5. Гнездата се измиват трикратно с PBS-Tween (допълнение 4).
6. Изготвя се подходящо разреждане на противомитохондрични имуноглобулини, конюгирани с алкална фосфатаза в PBS. Добавят се 190 μm във всяко гнездо. Инкубира се при 37 °C за два часа.
7. Гнездата се измиват трикратно с PBS-Tween (допълнение 4).
8. Изготвя се 100 μm алкален фосфатазен субстратен разтвор, съдържащ 1 mg п-нитрофенил фосфат на ml субстратен буфер (допълнение 4). Добавят се 200 μm към всяко гнездо. Инкубира се на тъмно при стайна температура и се отчита абсорбция при 40 nm на равни интервали в рамките на 90 минути.

Интерпретиране на резултатите от Елайза тест:

Елайза тест е отрицателен, ако отчитането на средната оптична плътност (OD) от дубликатни пробни гнезда е < 2x OD от това в контролното гнездо с екстракт от отрицателна проба, при условие че всички оптичните плътности за положителните контроли са над 1,0 (след 90 минути инкубация със субстрата) и са по-големи от два пъти OD, получено за екстрактите от отрицателните проби.

Елайза тест е положителен, ако отчитанията на средната оптична плътност (OD) от дубликатни пробни гнезда е > 2x OD в екстракта от отрицателната проба при категоричното условие, че отчитанията на средната оптична плътност във всички отрицателни контролни гнезда са < 2x отчитанията в положителните контролни гнезда.

Отрицателни отчитания от Елайза в положителните контролни гнезда означава, че тестът не е проведен правилно или е бил инхибиран. Положителни отчитания от Елайза в отрицателни контролни гнезда означава, че е настъпило кръстосано заразяване или неспецифично свързване на антигела.

9. Тестване на биологична проба

Забележка: Предварителното тестване с този метод трябва да дава възможност за възпроизводимо откриване на 10^3 до 10^4 единици, образуващи колонии, на *R. Solanacearum* на ml, добавени към екстракти от проби, които са дали отрицателен резултат при предишно тестване (за приготвянето виж допълнение 3).

Най-висока чувствителност на откриване чрез този метод може да се очаква, когато се използват пряко приготвени екстракти от проби и оптимални условия за растеж. Но методът може да се прилага успешно и към екстракти, които са били съхранявани в глицерин при температура от -68 до -86 °C.

Протоколът по-долу е на базата на Janse (1988)

9.1. Използват се 10 тестови растения от възприемчив доматен култивар (например MoneyMaker или култивар със сходна възприемчивост, определена от тествачата лаборатория) във фаза трети същински лист за всяка проба. За подробна информация по отношение на културите виж допълнение 8. Могат също да се използват сини домати (например култивар Black Beauty или култивари със сходна възприемчивост), като се използват само растения във втора или трета фаза до пълно разгръщане на трети същински лист. Симптомите се проявяват по-слабо и се развиват по-бавно при синия доमत. Затова се препоръчва при възможност да се използва доматен разсад.

9.2. Разпределят се 100 µl екстракт от проби между тестовите растения.

9.2.1. Инокулация със спринцовка

Инокулират се стеблата на растенията точно над котиледоните, като се използва спринцовка с хиподермична игла (най-малко 23G). Пробата се разпределя между тестателните растения.

9.2.2. Инокулация чрез разрез

Растението се държи с два пръста и с пипета се отмерва капка (приблизително 5—10 µl) от суспендираната пелета върху стеблото между котиледоните и първи същински лист.

С помощта на стерилен скалпел се прави диагонален разрез с дължина около 1,0 cm на дълбочина приблизително 2/3 от дебелината на стеблото, като се започва от капката.

Разрезът се запечатва със стерилен вазелин от спринцовка.

9.3. С помощта на същата техника се инокулират пет растения с водна суспензия, съдържаща от 10^5 до 10^6 клетки на ml, изготвена от 48-часова култура на вирулентен биовар 2 щам на *R. Solanacearum*, като положителна контрола, и с пелетен буфер (допълнение 4), като отрицателна контрола. Положителните и отрицателните контролни растения се отделят от другите растения, за да се избегне кръстосано заразяване.

9.4. Тестовите растения се отглеждат се при карантинни условия за период до четири седмици при 25—30 °C и висока относителна влажност с подходящо напояване, за да се избегне прекомерното поливане или увяхване поради недостиг на вода. За да се избегне заразяването на растенията, инкубирането им за положителна и отрицателна контрола става на отделни стендове в оранжерия или камера за нарастване или, ако пространството е ограничено, се осигурява стриктно разделяне при третирането им. Ако растения, предназначени за различни проби, трябва да се инкубират близо едни до други те се отделят с подходящи екрани. При торене, напояване, инспектиране и други манипулации се полагат специални грижи, за да не се допусне кръстосано заразяване. От съществено значение е в оранжерии и камерите за нарастване да не се допуснат никакви насекоми вредители, тъй като те могат да пренесат бактерията от проба на проба.

Наблюдава се за симптоми на увяхване, епинастия, хлороза и/или закъряване.

- 9.5. Изолират се от инфектираните растения (раздел II, точка 3) и се идентифицират културите без предполагаемо заразяване с *R. Solanacearum* (раздел VI, точка Б).
- 9.6. Ако след три седмици не се наблюдават никакви симптоми, се извършва IF тест, PCR тест или изолационен тест на съставна проба от части от стеблото с дължина 1 cm от всички тестателни растения, взети над мястото на инокулация. Ако тестът е положителен, се прави разреждане в петра (точка 4.1).
- 9.7. Идентифицират се всички растения без предполагаемо заразяване с *R. Solanacearum* (раздел VI, точка Б).

Интерпретиране на резултатите от тестването на биологична проба

Валидни резултати от тестването на биологична проба се получават, когато растенията от положителната контрола показват типични симптоми, от тези растения може повторно да се изолира бактерията и по отрицателните контроли не са установени никакви симптоми.

Тестването на биологична проба е отрицателно, ако тестовите растения не са заразени с *R. Solanacearum* и при условие че *R. Solanacearum* е открита в положителните контроли.

Тестването на биологична проба е положително, ако тестателните растения са заразени с *R. Solanacearum*.

Б. ТЕСТОВЕ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ

Определят се чисти култури на предполагаеми изолати на *R. Solanacearum*, като се използват най-малко два от дадените по-долу тестове на основата на различни биологични принципи.

За всеки извършен тест се включват познати референтни шамове в зависимост от случая (виж допълнение 3).

1. Хранителни и ензимни тестове за определяне

Определят се следните фенотипни свойства, които универсално присъстват или отсъстват в *R. Solanacearum*, в съответствие с методите на Lelliott и Stead (1987), Klement *et al.* (1990), Schaad (2001).

Тест	Очакван резултат
Производство на флуоресцентен пигмент	–
Поли-β-хидроксibuтиратни включения	+
Окислителен/ферментационен (O/F) тест	O+/F–
Каталазна активност	+
Оксидазен тест на Ковач	+
Редуциране на нитрат	+
Утилизиране на цитрат	+
Растеж при 40 °C	–
Растеж в 1 % Na Cl	+
Растеж в 2 % Na Cl	–
Аргининова дехидролазна активност	–
Втечняване на желатин	–
Хидролиза на скорбяла	–
Хидролиза на ескулин	–
Производство на леван	–

2. IF тест

- 2.1. Приготвя се суспензия с приблизително 10^6 клетки на ml в IF буфер (допълнение 4).
- 2.2. Приготвя се серия с двойно разреждане на подходящ антисерум (виж интернет страница <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).
- 2.3. Прилага се IF процедура (раздел VI, точка А, точка 5).
- 2.4. Постигнат е положителен IF тест, ако IF титърът на културата е еквивалентен на IF титъра на положителната контрола.

3. Елайза тест

Забележка: Ако се изпълняват само 2 теста за определяне, не се използва друг серологичен тест в допълнение на този метод.

- 3.1. Приготвя се суспензия с приблизително 10^8 клетки на ml в IX PBS (допълнение 4).
- 3.2. Прилага се подходяща Елайза процедура със специфично моноклонално антитяло към *R. Solanacearum*.
- 3.3. Постигнат е положителен Елайза тест, ако Елайза отчитането, получено от културата, е не по-малко от половината от това, получено от положителната контрола.

4. PCR тестове

- 4.1. Приготвя се суспензия с приблизително 10^6 клетки на ml в молекулна стерилна вода.
- 4.2. Загряват се 100 μ l от клетъчната суспензия в затворени епруветки в подгряващ блок или вряща водна баня при 100 °C за четири минути. След това пробите може да се съхраняват при – 16 до – 24 °C, докато станат необходими.
- 4.3. Прилагат се подходящи PCR процедури за амплификация на специфичните за *R. Solanacearum* ампликони (например Seal *et al.* (1993); Pastrik и Maiss (2000); Pastrik *et al.* (2002); Boudazin *et al.* (1999); Opina *et al.* (1997), Weller *et al.* (1999).
- 4.4. Постигнато е положително определяне на *R. Solanacearum*, ако PCR ампликоните имат същия размер и имат същите полиморфизми по дължината на рестриционните фрагменти като за положителния контролен шам.

5. FISH тест

- 5.1. Изготвя се суспензия с приблизително 10^6 клетки на ml в UPW.
- 5.2. Прилага се FISH процедура (раздел VI, точка A, точка 7) с най-малко две специфични за *R. Solanacearum* олигопроби (допълнение 7).
- 5.3. Постигнат е положителен FISH тест, ако са получени едни и същи резултати от културата и от положителната контрола.

6. Профилиране на мастни киселини (FAP)

- 6.1. Културата се отглежда върху типичен соев агар (Oxoid) за 48 часа при 28 °C.
- 6.2. Прилага се подходяща FAP процедура (Janse, 1991; Stead, 1992).
- 6.3. Постигнат е положителен FAP тест, ако профилът на предполагаемата култура е идентичен с този на положителната контрола. 14:0 ЗОН, 16:0 ЗОН, 16:1 ЗОН и 18:1 ЗОН означава наличие на характерни мастни киселини, а отсъствие на 16:0 ЗОН в голяма степен е показателно за *Ralstonia* sp.

7. Методи за характеризирание на шамове

Препоръчва се един от следните методи за характеризирание на шамове за всеки нов случай на изолиране на *R. Solanacearum*.

За всеки направен тест се включват познати референтни шамове (виж допълнение 3).

- 7.1. Определяне на биовар

R. Solanacearum е разделена на биовари въз основа на способността за утилизирание и/или окисляване на три дизахариди и три хексоза алкохоли (Hayward, 1964 и Hayward *et al.*, 1990). В допълнение 2 е дадено описание на растежна среда за тест на биовари. Тестът може да се извърши успешно като средите се инокулират чрез пробождане с чисти култури на изолати на *R. Solanacearum* и се инкубират при 28 °C. Ако средите се разпределят в стерилни петри за клетъчни култури с 96 гнезда (200 μ на гнездо) може да се наблюдава промяна в цвета от маслинозелено в жълто в рамките на 72 часа, което означава положителен резултат от теста.

	Биовар				
	1	2	3	4	5
Утилизация на:					
Малтоза	–	+	+	–	+
Лактоза	–	+	+	–	+
D (+) Целобиоза	–	+	+	–	+
Манитол	–	–	+	+	+
Сорбит	–	–	+	+	–
Душцит	–	–	+	+	–

Допълнителните тестове разграничават биовар 2 подфенотипове

	Биовар 2А (световно разпространение)	Биовар 2А (разпространен в Чили и Колумбия)	Биовар 2Т (разпространен в тропичните зони)
Утилизация на трехалоза	–	+	+
Утилизация на мезо-инозитол	+	–	+
Утилизация на D рибоза	–	–	+
Пектолитна активност ⁽¹⁾	ниска	ниска	висока

⁽¹⁾ Виж Lelliott и Stead (1987)

7.2. Геномен фингърпринтинг

Молекулната диференциация на шамовете в *R. Solanacearum* комплекс може да се постигне, като се използват няколко техники, както следва:

- 7.2.1. Анализ на полиморфизмите по дължината на рестриционните фрагменти (RELP анализ) (Cook *et al.*, 1989).
- 7.2.2. PCR с повтаряща се последователност, използваща REP, BOX и ERIC праймери (Louws *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995).
- 7.2.3. Анализ на полиморфизмите по дължината на амплифицираните фрагменти (AFLP анализ) (Van der Wolf *et al.*, 1998).

7.3. PCR методи

Специфичните PCR праймери могат да се използват за диференциация на шамове от дивизия 1 (биовари 3, 4 и 5) и дивизия 2 (биовари 1, 2А и 2Т) на *R. solanacearum*, първоначално определени чрез RFLP анализ (Cook *et al.*, 1989) и 16S rDNA sequencing (Taghavi *et al.*, 1996).

В. ТЕСТ ЗА ПОТВЪРЖДАВАНЕ

Тестът за патогенност трябва да се направи като окончателно потвърждаване на диагностициране на *R. solanacearum* и за оценка на вирулентността на култури, идентифицирани като *R. solanacearum*.

1. Приготвя се инокул с приблизително 10^6 клетки на ml от 24-часова до 48-часова култура на изолата за тестване и подходящ положителен контролен шам на *R. solanacearum* (например NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; виж допълнение 3).
2. Инокулират се 5 до 10 доматени растения или растения на син домат във фаза трети същински лист (виж раздел VI, точка А, точка 9).

3. Инкубират се за не повече от две седмици при 25 до 28 °C и висока относителна влажност с подходящо напояване, за да се избегне прекомерното поливане или стрес от суша. При чистите култури типичното увяхване трябва да се получи в рамките на 14 дни. Ако след този период не са налице симптоми не може да се потвърди, че културата е патогенна форма на *R. solanacearum*.
 4. Наблюдават се за симптоми на увяхване и/или епинастия, хлороза или закърняване.
 5. От симптоматичните растения чрез отстраняване се изолира част от стеблото на около 2 cm над точката на инокулация. Натрошава се и се суспендира в малък обем стерилна дестилирана вода или 50 mM фосфатен буфер (допълнение 4). Изолира се от суспензията чрез разреждане чрез намазване или шрихово посяване върху подходяща среда, за предпочитане върху селективна среда (допълнение 2), инкубира се за 48 до 72 часа при 28 °C и се наблюдава за образуване на колонии, типични за *R. solanacearum*.
-

Допълнение 1

Лаборатории, които участват в оптимизирането и валидирането на протоколите

Лаборатория ⁽¹⁾	Място	Страна
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Viena и Linz	Австрия
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Белгия
Plantedirektoratet	Lyngby	Дания
Central Science Laboratory	York	Англия
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburgh	Шотландия
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	Франция
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Франция
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Германия
Pflanzenschutzamt Hannover	Hanovra	Германия
State Laboratory	Dublin	Ирландия
Dipartimento di Scienze e Tecnologia Agroambientali	Bologna	Италия
Regione Veneto Unità Periferica per i Servizi Fitosanitari	Verona	Италия
Nederlandse Algemene Keuringsdienst	Emmeloord	Нидерландия
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Нидерландия
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lisabona	Португалия
Centro Diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	Испания
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias	Valencia	Испания
Swedish University of Agricultural Sciences	Uppsala	Швеция

(¹) Учени за контакти: виж интернет страница <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

Допълнение 2

Среда за изолиране и култивиране на *R. solanacearum***а) Обща растежна среда***Хранителен агар (NA)*

Хранителен агар (Difco) 23,0 g

Дестилирана вода 1,0 l

Разтварят се съставките и се стерилизират чрез автоклав при 121 °C за 15 минути.

Дрождов пептонов глюконен агар (YPGA)

Дрождов екстракт (Difco) 5,0 g

Бакто-пептон (Difco) 5,0 g

D(+) Глюкоза (монохидрат) 10,0 g

Бакто-агар (Difco) 15,0 g

Дестилирана вода 1,0 l

Разтварят се съставките и се стерилизират чрез автоклав при 121 °C за 15 минути.

Захарозов пептонов агар (SPA)

Захароза 20,0 g

Бакто-пептон (Difco) 5,0 g

K₂HPO₄ 0,5 gMgSO₄·7H₂O 0,25 g

Бакто-агар (Difco) 15,0 g

Дестилирана вода 1,0 l

pH 7,2—7,4

Разтварят се съставките и се стерилизират чрез автоклав при 121 °C за 15 минути.

Тетразолиева среда на Келман

Casamino киселини (Difco) 1,0 g

Бакто-пептон (Difco) 10,0 g

Декстроза 5,0 g

Бакто-агар (Difco) 15,0 g

Дестилирана вода 1,0 l

Разтварят се съставките и се стерилизират чрез автоклав при 121 °C за 15 минути.

Охлаждат се до 50 °C и се добавя капково-стерилизиран разтвор на 2,3,5-трифенил тетразолиев хлорид (Sigma) за получаване на окончателната концентрация от 50 mg на l.

б) Потвърдена селективна растежна среда*SMSA среда (Englebrecht, 1994 с измененията в Elphinstone et al., 1996)**Основна среда*

Casamino киселини (Difco) 1,0 g

Бакто-пептон (Difco) 10,0 g

Глицерин 5,0 ml

Бакто-агар (Difco); виж Забележка 2 15,0 g

Дестилирана вода 1,0 l

Разтварят се съставките и се стерилизират чрез автоклав при 121 °C за 15 минути.

Охлаждат се до 50 °C и се добавят капково-стерилизирани водни основни разтвори на следните съставки за получаване на определените крайни концентрации:

Кристалвиолет (Sigma)	5 mg на l
Полимиксин-В-сулфат (Sigma P-1004)	600 000 U (около 100 mg) на l
Бацитрацин (Sigma B-0125)	1250 U (около 25 mg) на l
Хлорамфеникол (Sigma C-3175)	5 mg на l
Пеницилин-G (Sigma P-3032)	825 U (около 0,5 mg) на l
2,3,5-трифенил тетразолиев хлорид (Sigma)	50 mg на l

Забележка:

1. Използването на реагенти, различни от определените по-горе, може да засегне растежа на *R. Solanacearum*.
2. Може да се използва Oxoid Агар # 1 вместо бакто-агар (Difco). В такъв случай растежът на *R. Solanacearum* ще се забави, въпреки че растежът на конкурентните сапрофити може също да се редуцира. За формирането на типичните колонии на *R. Solanacearum* може да са необходими 1 до 2 дни повече, а червеното оцветяване може да е по-светло и по-разредоточено отколкото при бакто-агара.
3. Увеличена концентрация на бацитрацина до 2500 U на l може да редуцира популациите от конкурентни бактерии без да засегне растежа на *R. Solanacearum*.

Средите и основните разтвори на антибиотиците се съхраняват при 4 °C на тъмно и се използват в срок от един месец.

Преди използване по повърхността на петрите не трябва да има кондензация.

Избягва се прекомерно изсушаване на петрите.

Контрол върху качеството трябва да се осъществява след изготвянето на всяка нова партида от среда, като се прави посяване в петра на суспензия от референтна култура на *R. Solanacearum* (виж допълнение 3) и се наблюдава формирането на типични колонии след инкубиране при 28 °C за два до пет дни.

в) **Потвърдена обогатителна среда**

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

Изготвя се като за SMSA селективна агарна среда, но се изключват бакто-агар и 2,3,5-трифенил тетразолиев хлорид.

Модифицирана хранителна среда на Вилбринк (Caruso et al., 2002)

Захароза	10 g
Протеозен пептон	5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,25 g
NaNO ₃	0,25 g
Дестилирана вода	1 l

Стерилизират чрез автоклав при 121 °C за 15 минути и се охлажда до 50 °C.

Добавят се основните антибиотични разтвори като при SMSA хранителна среда.

Допълнение 3

А. Стандартизиран контролен материал с търговско предназначение

а) Бактериални изолати

Препоръчва се използването на следните бактериални изолати като стандартен референтен материал или като положителни контроли (таблица 1), или по време на оптимизация на тестовете за избягване на кръстосани реакции (таблица 2). Всички щамове могат да се закупят от:

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

Таблица 1: SMT референтен панел на изолати на *R. Solanacearum*

NCPFB код	SMT #	Други кодове	Страна на произход	Биовар
NCPFB 4153	6	CFBP 4582, Pr 3020, EURS11	Египет	2
NCPFB 4154	10	CFBP 4585, 550, EURS21	Турция	2
NCPFB 3857	12	CFBP 4587, Pr 1140, EURS26	Англия	2
NCPFB 1584	23	CFBP 4598, EURS49	Кипър	2
NCPFB 2505	24	CFBP 4599, EURS50	Швеция	2
NCPFB 4155	26	CFBP 4601, 502, EURS55	Белгия	2
NCPFB 4156 (*)	71 (*)	PD 2762, CFBP 3857	Нидерландия	2
NCPFB 4157	66	LNPV 15.59	Франция	2
NCPFB 4158	39	CFBP 4608, Port 448, EURS80	Португалия	2
NCPFB 4160	69	IVIA-1632-2	Испания	2
NCPFB 4161	76	B3B	Германия	2
NCPFB 325	41	CFBP 2047, KEL60-1, R842	САЩ	1
NCPFB 3967	42	CFBP 4610, R285, GONG7	Коста Рика	1
NCPFB 4028	43	CFBP 4611, R303/571, CIP310, SEQ205	Колумбия	2
NCPFB 3985	44	CFBP 4612, R578, CIP312	Перу	2Т
NCPFB 3989	45	CFBP 4613, R568, CIP226	Бразилия	2Т
NCPFB 3996	46	CFBP 3928, R276/355, CIP72, SEQ225	Перу	3
NCPFB 3997	47	CFBP 4614, R280/363, CIP49, HAY0131a	Австралия	3
NCPFB 4029	48	CFBP 4615, R297/349, CIP121, CM1b2861	Шри Ланка	4
NCPFB 4005	49	CFBP 4616, R470	Филипини	4
NCPFB 4011	50	CFBP 4617, R288, HEmps2	Китай	5

(*) Използва се като стандартен референтен шам на *R. Solanacearum* биовар 2 (род 3).

Забележка: Автентичността на щамовете, дадени по-горе, е гарантирана само ако са получени от автентична култивирана колекция.

Таблица 2: SMT референтен панел на серологично или генетично свързани бактерии, предназначени за използване при оптимизиране на тестовете за откриване на наличие на бактерии

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

⁽¹⁾ Шам с потенциално кръстосано реагиране в серологични тестове (IF и/или Елайза) с поликлонални антисеруми.

⁽²⁾ Шам, от който в някои лаборатории може да се амплифицира PCR продукт със сходен размер на този, очакван при използването на специфичните праймери OLI-1 и Y-2 (виж допълнение 6).

⁽³⁾ Вероятност за кръстосано реагиране в повечето тестове, но се наблюдават само по бананите в Индонезия.

б) Стандартизиран контролен материал с търговско предназначение

Следният стандартен контролен материал може да се достави от колекцията от култури на NCPFB.

Замразена изсушена пелета от картофен екстракт от 200 здрави картофени клубена като отрицателна контрола за всички тестове.

Замразена изсушена пелета от картофен екстракт от 200 здрави картофени клубена, съдържащи от 10^3 до 10^4 и от 10^4 до 10^6 клетки на *R. solanacearum* биовар 2 (шам NCPFB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) като положителни контроли за серологични и PCR тестове. Тъй като замразяването и изсушаването се отразяват на жизнеспособността, те не са подходящи за стандартни контроли за изолационни тестове и тествания на биологична проба.

Фиксирани с формалин суспензии на *R. solanacearum* биовар 2 (шам NCPFB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) с 10^6 клетки на ml като положителни контроли за серологични тестове.

Б. Изготвяне на положителни и отрицателни контроли за основните скринингови тестове PCR/IF и FISH

Произвежда се 48-часова култура на вирулентен шам на *R. Solanacearum* род 3/биовар 2 (например шам NCPFB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) върху основна SMSA среда и се суспендира в 10 mM фосфатен буфер за получаването на гъстота на клетките приблизително 2×10^8 cfu на ml. Това обикновено се получава с леко замътнена суспензия, еквивалентна на оптична плътност от 0,15 при 600 nm.

Отстраняват се сърцевините при надобеления край на 200 клубени от произведен сорт с бяла кора, за който се знае, че не е заразен с *R. Solanacearum*.

Надобелените краища на клубените се обработват по обичайния начин и пелетата се суспендира повторно в 10 ml.

Изготвят се 10 стерилни 1,5 ml микровиали с 900 µl от повторно суспендираната пелета.

Прехвърлят се 100 µl от суспензията на *R. Solanacearum* в първия микровиал. Разбърква се.

Определят се десетичните нива на заразяване чрез продължаване на разреждането в следващите пет микровиала.

Шестте заразени микровиала се използват като положителни контроли. Четирите незаразени микровиала се използват като отрицателни контроли. Микровиалите се етикетират съответстващо.

Изготвят се аликвоти от 100 µl в стерилни 1,5 ml микровиали и така се получават девет точни копия на всяка контролна проба. Съхраняват се при – 16 до – 24 °C до използването им.

Наличието и количественото определяне на *R. Solanacearum* в контролните проби трябва да се потвърди най-напред с IF тест.

За PCR теста се прави екстракция на ДНК от положителни и отрицателни контролни проби при всяка серия проби за тестване.

За IF и FISH тестовете се правят изследвания върху положителни и отрицателни контролни проби при всяка серия проби за тестване.

За IF, FISH и PCR изследванията трябва да се установи наличие на *R. Solanacearum* в най-малко 10^6 и 10^4 клетки/ml на положителните контроли и в нито една от отрицателните контроли.

Допълнение 4

Буфери за тестови процедури

Обща разпоредба: Неотворените стерилизирани буфери могат да се съхраняват до една година.

1. Буфери за екстракционна процедура**1.1. Екстракционен буфер (50 mM фосфатен буфер, рН 7,0)**

Този буфер се използва за екстракция на бактерията от растителни тъкани чрез хомогенизиране или разклащане.

Na ₂ HPO ₄ (анхидриран)	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
Дестилирана вода	1,00 l

Разтварят се съставките, проверява се рН и се стерилизира чрез автоклав при 121 °C за 15 минути.

Могат да бъдат полезни и следните допълнителни компоненти:

	Предназначение	Количество (на l)
Луброл люспест	Дефлокулант (*)	0,5 g
ДС силиконов антипенител	Антипенител (*)	1,0 ml
Тетранатриев пирофосфат	Анти-оксидант	1,0 g
Поливинилпирилодон-40000 (рвр-40)	Свързване на PCR инхибитори	50 g

(*) Използва се с метода за хомогенизирана екстракция.

1.2. Пелетен буфер (50 mM фосфатен буфер, рН 7,2)

Този буфер се използва за повторно суспендиране и разреждане на екстракти от сърцевина при надебелената част на картофени клубени след концентрацията им в пелети чрез центрофугиране.

Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	0,4 g
Дестилирана вода	1,0 l

Разтварят се съставките, проверява се рН и се стерилизира чрез автоклав при 121 °C за 15 минути.

2. Буфери за IF тест**2.1. IF-буфер (10 mM фосфатен буферен физиологичен разтвор (PBS), рН 7,2)**

Този буфер се използва за разреждане на антитела.

Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	0,4 g
NaCl	8,0 g
Дестилирана вода	1,0 l

Разтварят се съставките, проверява се рН и се стерилизира чрез автоклав при 121 °C за 15 минути.

2.2. IF-буфер-Tween

Този буфер се използва за измиване на предметни стъкла.

Добавя се 0,1 % Tween 20 към IF буфера.

2.3. Фосфатен буферен глицерин, рН 7,6

Буферът е флуидно вещество върху прозорците на предметни стъкла за IF тест.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	3,2 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,15 g
Глицерин	50 ml
Дестилирана вода	100 ml

Предпазващи от обезцветяване разтвори могат да се закупят например от Vectashield® (Vector Laboratories) или Citifluor® (Leica).

3. Буфери за индиректен Елайза тест

3.1. Покривен буфер с двойна сила, рН 9,6

Na_2CO_3	6,36 g
NaHCO_3	11,72 g
Дестилирана вода	1,00 l

Разтварят се съставките, проверява се рН и се стерилизира чрез автоклав при 121 °C за 15 минути.

Може да се добави натриев сулфит (0,2 %) като антиоксидант, ако е необходимо да се предотврати изграждането на окислени ароматни съединения.

3.2. 10X Фосфатен буферен физиологичен разтвор, рН 7,4

NaCl	80,0 g
KH_2PO_4	2,0 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	29,0 g
KCl	2,0 g
Дестилирана вода	1,0 l

3.3. PBS-Tween

10X PBS	100 ml
10 % Tween 20	5 ml
Дестилирана вода	895 ml

3.4. Блокиращ (антитела) буфер (трябва да е прясно приготвен)

10X PBS	10,0 ml
Поливинилпирилодон-44000	2,0 g
10 % Tween 20	0,5 ml
Мляко на прах	0,5 g
Дестилирана вода	Допълва се до 100 ml

3.5. Алкален фосфатен субстратен разтвор, рН 9,8

Диетаноламин	97 ml
Дестилирана вода	800 ml

Размесва се и се регулира до рН 9,8 с концентрирана HCl.

Допълва се до 1 l с дестилирана вода.

Добавя се 0,2 g MgCl₂.

Разтварят се 2 фосфатазни субстратни 5 mg таблетки (Sigma) на 15 ml разтвор.

4. **Буфери за DASI Елайза тест**

4.1. Покривен буфер, рН 9,6

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g
Дестилирана вода	1000 ml

Разтварят се съставките и се проверява рН 9,6.

4.2. 10X Фосфатен физиологичен буфер (PBS) рН от 7,2 до 7,4

NaCl	80,0 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	4,0 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	27,0 g
Дестилирана вода	1000 ml

4.3. PBS-Tween

10X PBS	50 ml
10 % Tween 20	5 ml
Дестилирана вода	950 ml

4.4. Субстратен буфер, рН 9,8

Диетаноламин	100 ml
Дестилирана вода	900 ml

Размесва се и се регулира до рН 9,8 с концентрирана HCl.

Допълнение 5

Определяне на нивото на заразяване в IF и FISH тестове

1. Изчислява се средният брой типични флуоресцентни клетки за наблюдателно поле (c).
2. Изчислява се броят на типичните флуоресцентни клетки за прозорец на микроскопско предметно стъкло (C).

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

където: S = повърхността на прозореца на многоточково предметно стъкло

a s = повърхността на полето на обектива

$$s = \pi^2/4G^2K^2 \quad \text{където: } i = \text{коэффициента за поле (варира от 8 до 24 в зависимост от окуляра)}$$

K = коэффициента за епруетка (1 или 1,25)

G = увеличението на обектива (100 ×, 40 × и т.н.).

3. Изчислява се броят на типичните флуоресцентни клетки за ml повторно суспендирана пелета (N).

$$N = C \times 1000/y \times F$$

където: y = количеството на повторно суспендираната пелета върху всеки прозорец

a F = коэффициента на разреждане на повторно суспендираната пелета.

Допълнение 6

Потвърдени PCR протоколи и реагенти

NB: Предварителното тестване трябва да позволява възпроизводимо откриване на 10^3 до 10^4 клетки на *R. Solanacearum* на ml екстракт от проба.

Предварителното тестване не трябва да показва никакви фалшиви положителни резултати за панел от избрани бактериални шамове (виж допълнение 3).

1. PCR протокол на Seal *et al.* (1993)

1.1. Олигонуклеотидни праймери

Прав праймер OLI-1 5'-GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC-3'

Обратен праймер Y-2 5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'

Очакван размер на ампликон от *R. Solanacearum* матрична ДНК = 288 bp

1.2. Микс за PCR реакция

Реагент	Количество на реакция	Крайна концентрация
Стерилна UPW	17,65 µl	
10X PCR буфер ⁽¹⁾ (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
dNTP микс (20 mM)	0,25 µl	0,2 mM
Праймер OLI-1 (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Праймер Y-2 (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Taq полимераза (5U/µl) ⁽¹⁾	0,1 µl	0,5 U
Обем на пробата	2,0 µl	
Общ обем	25 µl	

⁽¹⁾ Методът е потвърден като е използвана Taq полимераза от Perkin Elmer (AmpliTaq) и Gibco BRL.

1.3. Условия за PCR реакция

Провеждат се следните програми:

- | | | |
|--------------|------|--|
| 1 цикъл от | i) | 2 минути при 96 °C (денатурация на матрична ДНК) |
| 35 цикъла от | ii) | 20 секунди при 94 °C (денатурация на матрична ДНК) |
| | iii) | 20 секунди при 68 °C (отгряване на праймери) |
| | iv) | 30 секунди при 72 °C (удължаване на копие) |
| 1 цикъл от | v) | 10 минути при 72 °C (окончателно удължаване) |
| | vi) | спиране при 4 °C. |

NB: Тази програма е оптимизирана за използване с термоцилично устройство Perkin Elmer 9600. При използване с други модели може да е необходима модификация на продължителността на стъпки ii), iii) и iv).

1.4. Анализ на ампликоните по отношение на рестрикционните ензими

PCR продуктите, амплифицирани от ДНК на *R. Solanacearum*, произвеждат ясно изразен полиморфизъм по дължината на рестрикционните фрагменти с ензим Ava II след инкубиране при 37 °C.

2. PCR протокол на Pastrik и Maiss (2000)

2.1. Олигонуклеотидни праймери

Прав праймер Ps-1 5'-agt cga acg gca gcg ggg g-3'
 Обратен праймер Ps-2 5'-ggg gat ttc aca tcg gtc ttg ca-3'

Очакван размер на ампликон от *R. Solanacearum* матрична ДНК = 553 bp

2.2. Микс за PCR реакция

Реагент	Количество на реакция	Крайна концентрация
Стерилна UPW	16,025 µl	
10X PCR буфер (1)	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (фракция V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
d-пТР микс (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Праймер Ps-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Праймер Ps-2 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Taq полимераза (5U/µl) (1)	0,1 µl	0,5 U
Обем на пробата	5,0 µl	
Общ обем:	25,0 µl	

(1) Методите са потвърдени, като е използвана Taq полимераза от Perkin Elmer (AmpliTaq) и Gibco BRL.

NB: Първоначално оптимизирани за MJ Research PTC 200 термоциклично устройство с Gibco Taq Полимераза. Perkin Elmer AmpliTaq и буфер могат също да се използват при същите концентрации.

2.3. Условия за PCR реакция

Провеждат се следните програми:

1 цикъл от i) 5 минути при 95 °C (денатурация на матрична ДНК)
 35 цикъла от ii) 30 секунди при 95 °C (денатурация на матрична ДНК)
 iii) 30 секунди при 68 °C (отпяване на праймери)
 iv) 45 секунди при 72 °C (удължаване на копие)
 1 цикъл от v) 5 минути при 72 °C (окончателно удължаване)
 vi) спиране при 4 °C.

NB: Тази програма е оптимизирана за използване с термоциклично устройство MJ Research PTC 200. При използване с други модели може да е необходима модификация на продължителността на стъпки ii), iii) и iv).

2.4. Анализ на ампликоните по отношение на рестрикционните ензими

PCR продуктите, амплифицирани от ДНК на *R. Solanacearum*, произвеждат ясно изразен полиморфизъм по дължината на рестрикционните фрагменти с ензим Taq I след инкубиране при 65 °C за 30 минути. Рестрикционните фрагменти, получени от специфичен за *R. Solanacearum* фрагмент, са с размер 457 bp и 96 bp.

3. Съставен PCR протокол с вътрешен PCR контрол (Pastrik et al., 2002)

3.1. Олигонуклеотидни праймери

Прав праймер RS-1-F 5'-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3'
 Обратен праймер RS-1-R 5'-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3'
 Прав праймер NS-5-F 5'-AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G-3'
 Обратен праймер NS-6-R 5'-GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC-3'

Очакван размер на ампликон от *R. Solanacearum* матрична ДНК = 718 bp (набор RS-праймери)

Очакван размер на ампликон от 18S rRNA вътрешен PCR контрол = 310 bp (набор NS-праймери)

3.2. Микс за PCR реакция

Реагент	Количество на реакция	Крайна концентрация
Стерилна UPW	12,625 µl	
10X PCR буфер ⁽¹⁾ (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (фракция V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
d-nTP микс (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Праймер RS-1-F (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Праймер RS-1-R (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Праймер NS-5-F (10 µM) ⁽²⁾	0,15 µl	0,06 µM
Праймер NS-6-R (10 µM) ⁽²⁾	0,15 µl	0,06 µM
Taq полимераза (5 U/µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1,0 U
Обем на пробата	5,0 µl	
Общ обем:	25,0 µl	

⁽¹⁾ Методите са потвърдени, като е използвана Taq полимераза от Perkin Elmer (AmpliTaq) и Gibco BRL.

⁽²⁾ Концентрацията на праймерите NS-5-F и NS-6-R е оптимизирана за екстракция на картофена сърцевина от наддебелената част, като се използва методът на хомогенизиране и пречистване на ДНК според Пастрик (2000) (виж раздел VI, точка А, точка 6.1, буква а). Повторна оптимизация на концентрациите на реагентите е необходима, когато е използвана екстракция чрез разклащане или други методи за изолиране на ДНК.

3.3. Условия за PCR реакция

Провеждат се следните програми:

- 1 цикъл от:
- i) 5 минути при 95 °C (денатурация на матрична ДНК)
- 35 цикъла от:
- ii) 30 секунди при 95 °C (денатурация на матрична ДНК)
 - iii) 30 секунди при 58 °C (отгряване на праймери)
 - iv) 45 секунди при 72 °C (удължаване на копие)
- 1 цикъл от:
- v) 5 минути при 72 °C (окончателно удължаване)
 - vi) спиране при 4 °C.

NB: Тази програма е оптимизирана за използване с термоцилично устройство MJ Research PTC 200. При използване с други модели може да е необходима модификация на продължителността на стъпки ii), iii) и iv).

3.4. Анализ на ампликоните по отношение на рестрикционните ензими.

PCR продуктите, амплифицирани от ДНК на *R. Solanacearum*, произвеждат ясно изразен полиморфизъм по дължината на рестрикционните фрагменти с ензим Bsm I или с изосхизомер (например Mva 12691) след инкубиране при 65 °C за 30 минути.

4. PCR протокол, специфичен за *R. Solanacearum* биовар (Pastrik et al., 2001)

4.1. Олигонуклеотидни праймери

- Прав праймер RS-1-F 5'-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3'
- Обратен праймер RS-1-R 5'-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3'
- Обратен праймер RS-3-R 5'-TTC ACG GCA AGA TCG CTC-3'

Очакван размер на ампликон от *R. Solanacearum* матрична ДНК:

c RS - 1 - F/ RS - 1 - R = 718 bp

c RS - 1 - F/ RS - 3 - R = 716 bp.

4.2. Микс за PCR реакция

а) PCR специфичен за биовар 1/2

Реагент	Количество на реакция	Крайна концентрация	
Стерилна UPW	12,925 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)	
10X PCR Буфер (1)	2,5 µl		
BSA (фракция V) (10 %)	0,25 µl		0,1 %
d-NTP микс (20mM)	0,125 µl		0,1 mM
Праймер Rs-1-F (10 µM)	2 µl		0,8 µM
Праймер Rs-1-R (10 µM)	2 µl		0,8 µM
Taq полимераза (5U/µl) (1)	0,2 µl		1 U
Обем на пробата	5,0 µl		
Общ обем:	25,0 µl		

(1) Методите са потвърдени, като е използвана Taq полимераза от Perkin Elmer (AmpliTaq) и Gibco BRL.

б) PCR специфичен за биовар 3/4/5

Реагент	Количество на реакция	Крайна концентрация	
Стерилна UPW	14,925 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)	
10X PCR Буфер (1)	2,5 µl		
BSA (фракция V) (10 %)	0,25 µl		0,1 %
d-NTP микс (20mM)	0,125 µl		0,1 mM
Праймер Rs-1-F (10 µM)	1 µl		0,4 µM
Праймер Rs-3-R (10 µM)	1 µl		0,4 µM
Taq полимераза (5U/µl) (1)	0,2 µl		1 U
Обем на пробата	5,0 µl		
Общ обем:	25,0 µl		

(1) Методите са потвърдени, като е използвана Taq полимераза от Perkin Elmer (AmpliTaq) и Gibco BRL.

4.3. Условия за PCR реакция

Провеждат се следните програми за специфичните реакции за биовар 1/2 и биовар 3/4/5

- 1 цикъл от: i) 5 минути при 95 °C (денатурация на матрична ДНК)
- 35 цикъла от: ii) 30 секунди при 95 °C (денатурация на матрична ДНК)
- iii) 30 секунди при 58 °C (отгряване на праймери)
- iv) 45 секунди при 72 °C (удължаване на копие)
- 1 цикъл от: v) 5 минути при 72 °C (окончателно удължаване)
- vi) спиране при 4 °C.

NB: Тази програма е оптимизирана за използване с термоциклично устройство MJ Research PTC 200. При използване с други модели може да е необходима модификация на продължителността на стъпки ii), iii) и iv).

4.4. Анализ на ампликоните по отношение на рестрикционните ензими

PCR продуктите, амплифицирани от ДНК на *R. Solanacearum*, като се използват праймерите Rs-1-F и Rs-1-R, произвеждат ясно изразен полиморфизъм по дължината на рестрикционните фрагменти с ензим Bsm I или с изосхизомер (например Mva 1269 I) след инкубиране при 65 °C за 30 минути. PCR продуктите, амплифицирани от ДНК на *R. Solanacearum*, като се използват праймерите Rs-1-F и Rs-3-R, нямат рестрикционни местоположения.

5. Приготвяне на зареждащия буфер**5.1. Бромфенолово синьо (10 %-основен разтвор)**

Бромфенолово синьо	5 g
Дестилирана вода (bidest)	50 ml

5.2. Зареждащ буфер

Глицерин (86 %)	3,5 ml
Бромфенолово синьо (5,1)	300 µl
Дестилирана вода (bidest)	6,2 ml

6. 10X Трис ацетатен EDTA (ТАЕ) буфер, рН 8.0

Трис буфер	48,40 g
Ледена оцетна киселина	11,42 ml
EDTA (двунариев сол)	3,72 g
Дестилирана вода	1,00 l

Разрежда се до 1X преди употреба.

Разпространява се в търговската мрежа (например инвитроген или негов еквивалент).

Допълнение 7

Потвърдени реагенти за FISH тест

1. Олигопроби

Специфична за *R. solanacearum* проба OLI-1-CY3: 5'-ggc agg tag caa gct acc ccc-3'

Неспецифична еубактерна проба EUB-338-FITC: 5'-gct gcc tcc cgt agg agt-3'

2. Фиксиращ разтвор

(ВНИМАНИЕ! ФИКСАТОРЪТ СЪДЪРЖА ПАРАФОРМАЛДЕХИД, КОЙТО Е ТОКСИЧЕН. ТРЯБВА ДА СЕ ИЗПОЛЗВАТ РЪКАВИЦИ, ДА НЕ СЕ ВДИШВА И ДА СЕ РАБОТИ В СМУКАТЕЛЕН ШКАФ ЗА ГАЗОВЕ.)

- Загряват се 9 ml молекулна вода (например ултра чиста вода (UPW) до приблизително 60 °C и се добавят 0,4 g параформалдехид. Параформалдехидът се разтваря след добавяне на 5 капки 1N NaOH и се разбърква с магнитна бъркалка.
- Регулира се рН до 7,0 чрез добавяне на 1 ml 0,1M фосфатен буфер (PB; рН 7,0) и 5 капки 1N HCl. Проверява се рН с индикаторни лентички и при необходимост се регулира с HCl или NaOH. (ВНИМАНИЕ! ДА НЕ СЕ ИЗПОЛЗВА РН МЕТЪР В РАЗТВОРИ С ПАРАФОРМАЛДЕХИД.)
- Филтрира се разтворът през 0,22 µm мембрана и се предпазва от запрашаване при 4 °C до следващата употреба.

3. 3X Хибмикс

NaCl	2,7 M
Трис HCl	60 mM (рН 7,4)
EDTA (капкова стерилизация и обработка в автоклав)	15 mM

Разрежда се до 1X съгласно изискванията.

4. Хибридиращ разтвор

1X Хибмикс	
Натриев додецил сулфат	0,01 %
Формаид	30 %
проба EUB 338	5 ng/µl
проба OLI-1 или OLI-2	5 ng/µl

Приготвя се хибридиращ разтвор в количества, които се определят съгласно таблица 1. За всяко предметно стъкло (съдържащо по два броя от 2 различни проби) е необходим 90 µl хибридиращ разтвор. ВАЖНО: ФОРМАМИДЪТ Е МНОГО ТОКСИЧЕН И Е НЕОБХОДИМО ДА СЕ ИЗПОЛЗВАТ РЪКАВИЦИ И ДА СЕ ВЗЕМАТ НЕОБХОДИМИТЕ ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ!

Таблица 1 Предложени количества за изготвяне на хибридиращ микс

Брой на предметните стъкла:	1	4	6	8	10
Стерилна UPW	23,1	92,4	138,6	184,8	231,0
3x хибмикс	30,0	120,0	180,0	240,0	300,0
1 % SDS	0,9	3,6	5,4	7,2	9,0
Формаид	27,0	108,0	162,0	216,0	270,0
Проба EUB 338 (100 ng/µl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Проба OLI-1 или OLI-2 (100 ng/µl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Общ обем (µl)	90,0	360,0	540,0	720,0	900,0

NB: Всички разтвори, съдържащи леки чувствителни олигопроби, се съхраняват на тъмно при – 20 °C. При употреба се предпазват от пряка слънчева светлина или електрическа светлина.

5. 0,1 М фосфатен буфер, рН 7,0

Na ₂ HPO ₄	8,52 g
KH ₂ PO ₄	5,44 g
Дестилирана вода	1,00 l

Разтварят се съставките, проверява се рН и се стерилизира чрез автоклав при 121 °С за 15 минути.

Допълнение 8

Кондициониране на култури от син домати и домати

Посяват се семена на домати (*Lycopersicon esculentum*) или син домати (*Solanum melongena*) в пастъризирани семенни компости. Разсадът с напълно развити котиледони (от 10 до 14 дни) се пресаждат в пастъризирани компости в съд.

Сините домати и домати трябва да се отглеждат във оранжерия при следните условия на околната среда преди инокулация:

Продължителност на деня	14 часа или естествената продължителност на деня, ако е по-голяма;
Температура	дневна от 21 до 24 °C, нощна от 14 до 18 °C.
Възприемчив сорт на домати	„Moneymaker“
Възприемчив сорт на син домати	„Black Beauty“
Доставчици	виж интернет страница http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

ИЗТОЧНИЦИ

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

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

ПРИЛОЖЕНИЕ III

1. За всяко съмнение за наличие, за което е идентифициран положителен резултат в скрининговия тест/скрининговите тестове, за изброения растителен материал и за всички други случаи, в съответствие с методите, посочени в приложение II, и за което се очаква потвърждаване или отхвърляне при приключване на упоменатите методи, следва да се извърши задържане и подходящо запазване на:
 - всички клубени, от които са взети проби, а при възможност и всички растения, от които са взети проби,
 - останал екстракт и допълнително изготвен материал за скрининговия тест/скрининговите тестове например имунофлуоресцентни предметни стъкла, и
 - цялата документация,до приключването на упоменатите методи.
2. В случай на положително потвърждаване на вредителя, следва да се извърши задържане и подходящо запазване на:
 - материалът, определен в точка 1,
 - проба от заразения материал от домт или син домат, инокулиран с екстракт от грудка или растение, в зависимост от случая,
 - и
 - изолираната култура на вредителя,за период поне от един месец след процедурата за уведомяване съгласно член 5, параграф 2.

ПРИЛОЖЕНИЕ IV

Елементите на разследването, посочено в член 5, параграф 1, буква а), i), в зависимост от случая, са както следва:

- i) място на производство, на което
- се отглеждат или са се отглеждали картофи, които са клонално свързани с картофи, за които е установено заразяване с вредителя,
 - се отглеждат или са се отглеждали домати, които са от един и същ източник с домати, за които е установено заразяване с вредителя,
 - се отглеждат или са се отглеждали картофи или домати, които са поставяни под официален контрол поради съмнение за наличие на вредителя,
 - се отглеждат или са се отглеждали картофи, които са клонално свързани с картофи, които са отглеждани на производствени участъци, за които е установено заразяване с вредителя,
 - се отглеждат картофи или домати и е разположено в близост до заразени места за производство, включително места за производство, които използват общо производствено оборудване и съоръжения пряко или чрез общ изпълнител,
 - се използва повърхностна вода за напояване или дъждуване от източник, за който е потвърдено или има съмнение за заразяване с вредителя,
 - се използва повърхностна вода за напояване или дъждуване от източник, използван съвместно с места за производство, за които е потвърдено или има съмнение за заразяване с вредителя,
 - има или е имало наводнение от повърхностна вода, за която е потвърдено или има съмнение за заразяване с вредителя;
- и
- ii) повърхностна вода, която е използвана за напояване или дъждуване на продукцията или е наводнявала полето/полетата или мястото/местата на производство, за която е потвърдено заразяване с вредителя.
-

ПРИЛОЖЕНИЕ V

1. Елементите, които следва да се вземат предвид при определянето на размера на вероятното заразяване съгласно член 5, параграф 1, буква а), iii) и 5, параграф 1, буква в), iii), са както следва:
 - изброеният растителен материал, отгледан на място на производство, определен като заразен съгласно член 5, параграф 1, буква а), ii),
 - място/места на производство с някаква производствена връзка с изброения растителен материал, определен като заразен съгласно член 5, параграф 1, буква а), ii), включително които използват общо производствено оборудване и съоръжения пряко или чрез общ изпълнител,
 - изброеният растителен материал, отгледан на място/места на производство, посочени в предходното тире или който се е намирал на такова място/места по времето, когато изброеният растителен материал, определен като заразен съгласно член 5, параграф 1, буква а), ii), се е намирал на мястото на производство, посочено в първото тире,
 - помещенията за работа с изброения растителен материал от местата за производство, посочени в горните тирета,
 - всяка машина, превозно средство, съд, склад или техни елементи и всички други предмети, включително опаковъчен материал, за които има вероятност да са били в контакт с изброения растителен материал, определен като заразен съгласно член 5, параграф 1, буква а), ii),
 - всеки от изброения растителен материал, съхраняван в или в контакт със структурите или предметите, изброени в предходното тире, преди тези структурите или предметите да бъдат почистени и дезинфекцирани,
 - в резултат на разследването и тестването съгласно член 5, параграф 1, буква а), i), когато става въпрос за картоф — грудките или растенията с дъщерни или родителски клонални връзки, а когато става въпрос за домати — растенията от един и същ източник, с изброения растителен материал, определен като заразен съгласно член 5, параграф 1, буква а), ii), и за които, независимо че може да са получени отрицателни резултати от тестването за наличие на вредителя, заразяването изглежда възможно чрез клонална връзка. Може да се направи сортово тестване, за да се удостовери идентичността на заразените и клонално свързаните клубени и растения,
 - място/места на производство на изброения растителен материал, посочен в предходното тире,
 - място/места на производство на изброения растителен материал, които използват вода за напояване или дъждуване, определена като заразна съгласно член 5 параграф 1, буква в), ii),
 - изброен растителен материал, произведен на полета, наводнявани от повърхностна вода, за която е потвърдено, че е заразна.
2. Елементите, които следва да се вземат предвид при определянето на размера на вероятното заразяване съгласно член 5, параграф 1, буква а), iv) и член 5, параграф 1, буква в), iii), са, както следва:
 - i) в случаите съгласно член 5, параграф 1, буква а), iv),
 - близост до други места на производство, където се отглежда изброеният растителен материал,
 - общо производство и използване на домати за семе,
 - места на производство, които използват вода за напояване или дъждуване на изброения растителен материал, в случаи когато има или е имало риск от отток на повърхностни води от място/места на производство или от наводняване на място/места на производство, определени като заразени съгласно член 5 параграф 1, буква а), ii).

- ii) в случаите когато повърхностна вода е определена като заразена съгласно член 5 параграф 1, буква в), iii):
- място/места на производство, на които се произвежда изброеният растителен материал, които са прилежащи до или под риск от наводняване от повърхностна вода, определена като заразена,
 - всеки отделен напоителен басейн, свързан с повърхностна вода, определена като заразена,
 - водоемници, свързани с повърхностна вода, определена като заразена, като се имат предвид:
 - посоката и дебита на водата, определена като заразена,
 - наличието на диви растения гостоприемници на *Solanaceous*.

3. Уведомлението, посочено в член 5, параграф 2, първа алинея се прави, както следва:

- незабавно след като се потвърди наличието на вредителя чрез лабораторно тестване, в което са използвани методите, дадени в приложение II, се предоставя най-малко следното:
 - за картофите,
 - а) име на сорта на партидата,
 - б) тип (изделие, семена и т.н.) и, в зависимост от случая, категория на семената,
 - за доматените растения, име на сорта на партидата и, в зависимост от случая, категорията.
- без да накръняват изискванията за уведомяване при съмнение за наличие на бактерията в член 4, параграф 3, държавата-членка, за която е потвърдено наличие, когато има опасност от заразяване на изброен растителен материал, излизащ от или влизащ в друга/и държава-членка/държави-членки, незабавно уведомява заинтересованата/ите държава-членка/държави-членки за необходимата информация за спазване на член 5, параграф 3, както следва:
 - а) име на сорта на партидата от картофи или домати,
 - б) име и адрес на консигнатора и консигнанта,
 - в) дата на доставка на партидата от картофи или домати,
 - г) размер на доставената партидата от картофи или домати,
 - д) копие на паспорта на растението или поне номер на паспорта на растението, в зависимост от случая, или, в зависимост от случая, регистрационен номер на производителя или търговеца и копие на описа на доставката.

Комисията незабавно се уведомява, когато се представи такава информация.

4. Подробните данни от допълнителното уведомление, посочено в член 5, параграф 2, втора алинея се прави, както следва:

След приключване на разследването за всеки случай се предоставя следното:

- а) дата на потвърждаване на заразяване,
- б) кратко описание на проведеното разследване с цел определяне на източника и вероятното пренасяне на заразата, включително и нивото на извършеното пробовземане,
- в) информация за идентифицирания/ите или предполагаем/и източник/източници на заразяване,
- г) подробни данни за размера на определеното заразяване, включително и броят на местата на производство и — за картофите — броят на партидите с означаване на сорта, а за картофите за посев — на категорията,

- д) подробни данни за района на разпространение, включително и броят на местата на производство, които не са определени като заразени, но са включени в района,
 - е) подробни данни за определянето на водата, включително и името и местоположението на водоема и степента на зараза/забрана за напояване,
 - ж) за всички пратки с домати растения или партиди, определени като заразени, сертификатите, предвидени в член 13, параграф 1, ii) от Директива 2000/29/ЕО, и номерът на паспорта в съответствие със списъка в част А, раздел I, точка 2.2 от приложение V към Директива 2000/29/ЕО,
 - з) всяка друга информация, която е свързана с потвърденото/ите огнище/огнища и която Комисията може да изиска.
-

ПРИЛОЖЕНИЕ VI

1. Разпоредбите, посочени в член 6, параграф 1, са:

- употреба като храна за животни след топлинна обработка, при която няма риск от оцеляване на вредителя,
или
- депониране на официално одобрено специализирано сметище, за което не е установен риск от изтичане на вредителя в околната среда, например чрез просмукване в селскостопански земи или влизане в контакт с водоизточници, които могат да се използват за напояване на селскостопански земи,
или
- изгаряне,
или
- промишлено преработване чрез директно и незабавно доставяне в преработвателен завод с официално одобрени сметища, за които не е установен риск от пренасяне на вредителя, и със система за почистване и дезинфекция поне на превозните средства, напускащи обекта,
или
- други мерки, при условие че не е установен риск от пренасяне на вредителя; Комисията и другите държави-членки се уведомяват за такива мерки и основанията за прилагането им.

Всички останали отпадъци, свързани със и възникнали от възможностите, посочени по-горе, се депонират с помощта на официално одобрени методи в съответствие с приложение VII към настоящата директива.

2. Подходящата употреба или депониране на изброения растителен материал, посочен в член 6, параграф 2, под контрола на отговорните официални органи на заинтересованата/ите държава-членка/държави-членки, със съответстващи комуникации между отговорните официални органи за осигуряване на такъв контрол през цялото време и одобряване от страна на отговорния официален орган на държавата-членка, в която картофите се пакетират или преработват, на сметищата, посочени в първо и второ тире, е, както следва:

i) за картофени клубени,

- употреба като картофени изделия, предназначени за консумация, опаковани за директна доставка и употреба без повторно опаковане, в обект със съответстващи сметища за депониране на отпадъци. Картофите, предназначени за засаждане, могат да се обработват в същия обект, ако това става отделно или след почистване и дезинфекция,
или
- употреба като картофени изделия, предназначени за промишлено преработване и директно и незабавно доставяне в преработвателен завод с официално одобрени сметища, за които не е установен риск от пренасяне на вредителя, и със система за почистване и дезинфекция поне на превозните средства, напускащи обекта,
или
- друга употреба или депониране, при условие че за тях е определено, че не е установен риск от пренасяне на вредителя, и след одобрение от страна на упоменатите отговорни официални органи.

ii) за други части на растенията, включително стеблото и остатъци от листната част,

- унищожаване
или
- друга употреба или депониране, при условие че за тях е определено, че не е установен риск от пренасяне на вредителя, и след одобрение от страна на упоменатите отговорни официални органи.

3. Подходящите методи за обеззаразяване на предметите, посочени в член 6, параграф 3, са почистване и, в зависимост от случая, дезинфекция, които да не допускат откриване на риск от пренасяне на вредителя и да се извършват под надзора на отговорните официални органи на държавите-членки.
4. Поредицата от мерки, които следва да се извършат от държавите-членки в рамките на района на разпространение, определен в съответствие с член 5 параграф 1, буква а), iv) и буква в), iii) и посочен в член 6, параграф 4, включва:
 - 4.1. Когато местата на производство са определени като заразени в съответствие с член 5, параграф 1, буква а), ii):
 - а) в поле или единица за производство на защитени култури, определени като заразени в съответствие с член 5 параграф 1, буква а), ii) или
 - i) през поне четири вегетативни години след годината, когато е определено заразяването,
 - се предприемат мерки за премахване на самораслите картофени и домати растения както и на други растения гостоприемници на вредителя, включително и плевели *Solanaceous*,
 - и
 - не се засаждат:
 - картофени клубени, растения или същински семена,
 - домати растения и семена
 - като се има предвид биологията на вредителя,
 - други растения гостоприемници,
 - растения от вида *Brassica*, за които има установен риск от оцеляване на вредителя,
 - растения, за които има установен риск от предаване на вредителя;
 - през първия сезон на прибиране на реколтата от картофи или домати след периода, определен в предходното тире, и при условие че е установено, че в полето няма саморасли картофени и домати растения както и други растения гостоприемници на вредителя, включително и плевели *Solanaceous*, по време на официални проверки на място през поне две последователни вегетативни години преди засаждане,
 - за картофите се разрешава само производството на картофени изделия,
 - за картофите и домати се изисква тестване на прибраните картофени клубени или на домати растения, в зависимост от случая, в съответствие с процедурата, описана подробно в приложение II;
 - през сезона на прибиране на картофите или домати, следващ упоменатия в предходното тире, и след подходящ цикъл на ротация, който трябва да е най-малко две години, когато ще се отглеждат картофи за семе, се извършва официално изследване, подробно разгледано в член 2, параграф 1;
 - или
 - ii) през поне пет вегетативни години след годината, когато е определено заразяването,
 - се предприемат мерки за премахване на самораслите картофени и домати растения както и на други растения гостоприемници на вредителя, включително и плевели *Solanaceous*,
 - и
 - полето се установява и поддържа през първите три години като необработена угар или засято със зърнени култури, в зависимост от установения риск, или като постоянно пасище с честа ниска коситба или интензивно пасене, или като трева за семепроизводство, а през следващите две години се засаждат растения, които не са гостоприемници на вредителя, за които не е установен риск от оцеляване или предаване на вредителя,

- през първия сезон на прибиране на картофите или домати, следващ упоменатия в предходното тире период, и при условие че е установено, че в полето няма саморасли картофени и домати растения както и други растения гостоприемници на вредителя, включително и плевели *Solanaceous*, по време на официални проверки на място поне през двете последователни вегетативни години преди засаждане,
 - за картофите се разрешава производството на семена и картофени изделия;
 - за картофите и домати се изисква тестване на прибраните картофени клубени или на домати растения, в зависимост от случая, в съответствие с процедурата, описана подробно в приложение II;
- б) във всички други полета в заразеното място на производство и при условие че отговорните официални органи са убедени, че рискът от саморасли картофени растения и домати растения, както и други естествено развиващи се растения гостоприемници на вредителя, включително и плевели *Solanaceous*, в зависимост от случая, е елиминиран:
- през вегетативната година след годината, когато е определено заразяването,
 - или не се засаждат картофени клубени, растения и същински семена, или други растения гостоприемници на вредителя,
 - или
 - за картофените клубени е разрешено засаждането на сертифицирани семенни картофи само за производство на картофени изделия,
 - за домати растения е разрешено отглеждането на домати растения от семе, което отговаря на изискванията на Директива 200/29/ЕО, само за производство на плодове;
 - през втората вегетативна година след годината, когато е определено заразяването,
 - за картофите се разрешава само засаждане на сертифицирани семенни картофи или семенни картофи, официално тествани за отсъствие на бактериално кафяво гниене и отгледани под официален контрол на места на производство, различни от посочените в 4.1, за производството на семена или на картофени изделия,
 - за домати се разрешава само засаждане на домати растения, отгледани от семе, което отговаря на изискванията на Директива 200/29/ЕО, или, в случай на вегетативно размножаване, от домати растения, произведени от такова семе и отгледани под официален контрол на места на производство, различни от посочените в 4.1, за производството на семена или плодове;
 - поне през третата вегетативна година след годината, когато е определено заразяването,
 - за картофите се разрешава само засаждане на сертифицирани семенни картофи или семенни картофи, отгледани под официален контрол от сертифицирани семенни картофи за производството на семена или на картофени изделия,
 - за домати се разрешава само засаждане на домати растения, отгледани от семе, което отговаря на изискванията на Директива 200/29/ЕО, или от домати растения, отгледани под официален контрол от такива растения, за производството на растения или плодове;
 - през всяка от вегетативните години, посочени в предходните тирета, се предприемат мерки за премахване на самораслите картофени растения, както и други естествено развиващи се растения гостоприемници на вредителя, ако има такива, и се извършват проверки на място през подходящи периоди и на всяко поле като официалното тестване на прибраните картофи се провежда в съответствие с процедурата, разгледана подробно в приложение II;
- в) незабавно след определяне на заразяването в съответствие с член 5, параграф 1, буква а), ii) и след първата последваща вегетативна година:
- всички машини и складови помещения на мястото на производство и включените в производството на картофи или домати се почистват, а в зависимост от случая и дезинфекцират с помощта на подходящи методи, определени в точка 3,
 - въвеждат се официални контролни мерки за програмите за напояване и дъждуване, включително и тяхното забраняване, в зависимост от случая, за да се предотврати пренасянето на вредителя;

г) в производствена единица за защитени култури, определена като заразена в съответствие с член 5, параграф 1, буква а), ii), където е възможна пълна подмяна на растителната среда,

- не се засаждат картофени клубени, растения или същински семена, или други растения гостоприемници на вредителя, включително домати растения и семена, докато производствената единица не се подложи на официално контролирани мерки за премахване на вредителя и за отстраняване на целия растителен материал гостоприемник, включително най-малко пълна смяна на растителната среда и почистване, а в зависимост от случая и дезинфектиране на единиците и цялото оборудване, и впоследствие получаване на одобрение от страна на отговорните официални органи за производство на картофи и домати,

и

- производството на картофи е от сертифицирани семенни картофи или от миниклубени или микрорастения, получени от тествани източници,
- производството на домати е от семе, което отговаря на изискванията на Директива 200/29/ЕО, или, при вегетативно размножаване, от домати растения, получени от такива семена и отгледани под официален контрол,
- въвеждат се официални контролни мерки за програмите за напояване и дъждуване, включително и тяхното забраняване, в зависимост от случая, за да се предотврати пренасянето на вредителя;

4.2. В рамките на района на разпространение, без да накърняват мерките, определени в точка 4.1, държавите-членки:

а) незабавно след определяне на заразяването осигуряват за всички машини и складови помещения на мястото на производство и включените в производството на картофи или домати почистване, а в зависимост от случая и дезинфекция с помощта на подходящи методи, определени в точка 3,

б) незабавно и най-малко за три вегетативни години след определяне на заразяването:

ба) в случаите когато зоната на разпространение е определена в съответствие с член 5 параграф 1, буква а), iv),

- осигуряват надзор от страна на своите отговорни официални органи върху помещенията за отглеждане, съхраняване и обработване на картофени клубени или домати заедно с помещенията, където се намират машините за производство на картофи или домати по договор,

- изискват засаждане само на сертифицирани семена или семена, отгледани под официален контрол за всички картофени реколти в рамките на зоната, както и тестване след прибиране на реколтите от семенни картофи, отгледани на места на производство, определени като вероятно заразени в съответствие с член 5 параграф 1, буква а), iii),

- изискват отделна обработка на прибраната продукция от семенни картофи от тази за картофени изделия във всички помещения в рамките на зоната или прилагането на система за почистване, а в зависимост от случая и дезинфекция, между обработването на семената и продукцията за картофени изделия,

- изискват засаждане само на домати растения, отгледани от семе, което отговаря на изискванията на Директива 2000/29/ЕО, или, при вегетативно размножаване, от домати растения, получени от такова семе и отгледани под официален контрол, за цялата домати реколта в рамките на зоната,

- провеждат официално изследване, разгледано подробно в член 2, параграф 1;

бб) в случаите когато повърхностна вода е определена като заразена в съответствие с член 5 параграф 1, буква в), iii) или включена в елементите за възможно предаване на вредителя в съответствие с приложение V, точка 2,

- извършват годишно изследване през подходящи периоди, включително и пробовземане от повърхностни води, а в зависимост от случая и от растения гостоприемници на *R. Solanacearum* в съответните водни източници, в съответствие с методите, предвидени в приложение II за изброения растителен материал и за други случаи,

- въвеждат официален контрол върху програмите за напояване и дъждуване, включително и забрана за използване на вода, определена като заразена, за напояване и дъждуване на изброения растителен материал, а в зависимост от случая и на други растения гостоприемници, за да се спре предаването на вредителя. Забраната може да се преразгледа на основата на резултатите, получени от упоменатото годишно изследване и определенията да се отменят, когато отговорните официални органи са убедени, че повърхностната вода вече не е заразена. Може да се разреши ползването на вода, за която има забрана, под официален контрол за напояване и дъждуване на растения гостоприемници, когато се използват официално одобрени техники за премахване на вредителя и предотвратяване на предаването му,
 - в случаите на изхвърляне на заразени течни отпадъци, въвеждат официални контролни мерки върху изхвърлянето на твърди и течни отпадъци от обекти за промишлено преработване или за опаковане, които работят с изброен растителен материал;
- в) изготвят програма, при необходимост, за подмяната на всички запаси от семенни картофи за определен период от време.
-

ПРИЛОЖЕНИЕ VII

Официално одобрените методи за депониране на отпадъци, посочени в приложение IV, точка 1, съответстват на следните изисквания, които за всеки установен риск от предаване на вредителя премахват този риск:

- i) картофени или домати отпадъци (включително шкартирани картофи и обелки, както и домати) и всички други твърди отпадъци, свързани с картофите и домати (включително почва, камъни и други парчета), се депонират или чрез
- депониране на официално одобрено специализирано сметище, за което не е установен риск от изтичане на вредителя в околната среда, примерно чрез просмукване в селскостопански земи или влизане в контакт с водоизточници, които могат да се използват за напояване на селскостопански земи. Отпадъците се извозват директно до сметището при контролирани условия, които не създават риск от загубване на следите на отпадъците,
 - или
 - изгаряне,
 - или
 - други мерки, при условие че не е установен риск от пренасяне на вредителя; Комисията и другите държави-членки се уведомяват за такива мерки,
- ii) течни отпадъци: преди депониране течните отпадъци, които съдържат неразтворени твърди вещества, се подлагат на филтриране или утаяване, за да се отстранят тези вещества. Неразтворените твърди вещества се депонират както е предвидено в i).

След това течните отпадъци:

- или се загряват най-малко до 60 °C за цялото количество в продължение на минимум 30 минути преди депонирането им,
- или
- се депонират по друг начин, официално одобрен и официално контролиран, за който не е установен риск от влизане на вредителя в контакт със селскостопански земи или с водоизточници, които могат да се използват за напояване на селскостопански земи. Другите държави-членки и Комисията се уведомяват подробно за него.

Възможните варианти, описани в настоящото приложение, се прилагат и за отпадъците, свързани с обработката, депонирането и преработката на заразени партиди.“
