

I

(Aktid, mille avaldamine on kohustuslik)

KOMISJONI DIREKTIIV 2006/56/EÜ,**12. juuni 2006,****millega muudetakse kartuli-ringmädaniku tõrjet käsitleva nõukogu direktiivi 93/85/EMÜ lisasid**

EUROOPA ÜHENDUSTE KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Ühenduse asutamislepingut,

võttes arvesse kartuli-ringmädaniku tõrjet käsitlevat nõukogu 4. oktoobri 1993. aasta direktiivi 93/85/EMÜ, ⁽¹⁾ eriti selle artiklit 12,

ning arvestades järgmist:

(1) Üks kartulile kahjulikke organisme on *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis *et al.* ssp. *sepedonicus* (Spieckermann *et* Kotthoff) Davis *et al.*, kartuli-ringmädaniku haigusetekitaja (edaspidi "organism").

(2) Organism esineb siiani mõnes ühenduses osas.

(3) Direktiivis 93/85/EMÜ on sätestatud üksikasjalikud meetmed, mida liikmesriigid peavad võtma organismi vastu, et kindlaks teha selle asukoht ja levik; vältida selle esinemist ja levikut; avastamise korral vältida selle levikut ja tõrjuda haigust likvideerimise eesmärgil.

(4) Vahepeal on toimunud märkimisväärne areng bioloogias ning organismi avastamise ja kindlaksmääramise menetluses; organismi tõrjel saadud praktiliste kogemuste toel tuleks läbi vaadata mitmed tõrjemeetmetega seotud tehnilised sätted.

(5) Nende arengute tulemusel on ilmselt vajalik läbi vaadata ja ajakohastada direktiivi 93/85/EMÜ lisades olevad meetmed.

(6) Avastamis- ja kindlaksmääramismenetluse on inkorporeeritud sellised hiljuti väljatöötatud menetlused nagu fluorestsents *in situ* hübridisatsioon (FISH) ja polümeraasi ahelreaktsioon (*polymerase chain reaction* – PCR) ning praeguse avastamis- ja kindlaksmääramismenetluse erinevate tehniliste osade täiustused.

(7) Tõrjemeetmete tehniliste osade puhul on täiendatud järgmisi osi: laboratoorselt analüüsitud kontrollproovide säilitamine nii, et oleks võimalik tagada organismi tagantjärele kindlakstegemine, võimaliku saastumise ulatuse kindlaksmääramiseks vajalikud tegurid, organismi mis tahes kinnitatud esinemisest ja asjaomasest saastunud tsoonist teatamise üksikasjad, saastunuks tunnistatud tootmiskohtades ja piiritletud tsoonides rakendatavad meetmed.

(8) Käesoleva direktiiviga ette nähtud meetmed on kooskõlas alalise taimetervise komitee arvamusega,

ON VASTU VÕTNUD JÄRGMISE DIREKTIIVI:

Artikkel 1

Direktiivi 93/85/EMÜ lisad asendatakse käesoleva direktiivi lisas olevate vastavate tekstidega.

Artikkel 2

1. Liikmesriigid võtavad vastu ja avaldavad käesoleva direktiivi järgimiseks vajalikud õigusnormid hiljemalt 31. märtsiks 2007. Liikmesriigid edastavad viivitamata komisjonile kõnealuste normide teksti ning nende normide ja käesoleva direktiivi vahelise vastavustabeli.

Liikmesriigid kohaldavad neid norme alates 1. aprillist 2007.

Kui liikmesriigid need normid vastu võtavad, lisavad nad nendes normidesse või nende normide ametliku avaldamise korral nende juurde viite käesolevale direktiivile. Viitamise viisi näevad ette liikmesriigid.

⁽¹⁾ EÜT L 259, 18.10.1993, lk 2.

2. Liikmesriigid edastavad viivitamata komisjonile käesoleva direktiiviga reguleeritavas valdkonnas nende poolt vastu võetud põhiliste riigisiseste õigusnormide teksti.

Artikkel 3

Käesolev direktiiv jõustub kolmandal päeval pärast selle avaldamist *Euroopa Liidu Teatajas*.

Artikkel 4

Käesolev direktiiv on adresseeritud liikmesriikidele.

Brüssel, 12. juuni 2006.

Komisjoni nimel
komisjoni liige
Markos KYPRIANOU

I LISA

RINGMÄDANIKU BAKTERI *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* (Smith) Davis *et al.* *SEPEDONICUS* (Spieckermann *et* Kotthoff) Davis *et al.* DIAGNOOSIMISE, AVASTAMISE JA KINDLAKSMÄÄRAMISE ANALÜÜSIMETOODIKA**ANALÜÜSIMETOODIKA RAKENDUSALA**

Käesoleva metoodikaga kirjeldatakse eri menetlusi, mis on seotud:

- i) ringmädaniku diagnoosimisega kartulimugulates ja -taimedes;
- ii) bakteri *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* avastamisega kartulimugulates ja -taimedes;
- iii) bakteri *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*C. m.* subsp. *sepedonicus*) kindlaksmääramisega.

ÜLDPÕHIMÕTTED

Erinevate meetodite optimeeritud protokollid, valideeritud reaktiivid ning üksikasjad analüüsi ja kontrollainete ettevalmistuse kohta on sätestatud liidetes. Liites 1 on sätestatud laborite nimekiri, mis tegelesid protokollide optimeerimisega ja valideerimisega.

Kuna protokollid hõlmavad ohtliku organismi avastamist ja bakteri *C. m.* subsp. *sepedonicus* elujõuliste kultuuride kasutamist kontrollmaterjalina, tuleb menetlus läbi viia sobivates karantiinitingimustes, kus on kohased jäätmete kõrvaldamise seadmed ning ametlike taimekarantiini asutuste välja antud litsentside kohased tingimused.

Analüüsiparameetrid peavad tagama bakteri *C. m.* subsp. *sepedonicus* järjepideva ja uuesti korratava avastamise valitud meetodites sätestatud piirmäärades.

Oluline on positiivsete kontrollproovide täpne ettevalmistamine.

Analüüside tegemisel vastavalt nõutavatele piirmääradele tuleb tähelepanu pöörata ka seadmete õigele seadistusele, hooldusele ja kalibreerimisele, reaktiivide hoolikale käitlemisele ja säilitamisele ning kõigile meetmetele, mille eesmärk on vältida proovide omavahelist saastumist, s.t positiivsete kontrollproovide eraldamisele analüüsitavatest proovidest. Tuleb kohaldada kvaliteedikontrolli standardeid, selleks et vältida halduslikke ja muid vigu, eelkõige seoses märgistamise ja dokumentidega.

Direktiivi 93/85/EMÜ artikli 4 lõikes 2 osutatud haiguse esinemise kahtlus tähendab proovi diagrammides määratletud diagnostiliste või sõelkatsete positiivset tulemust.

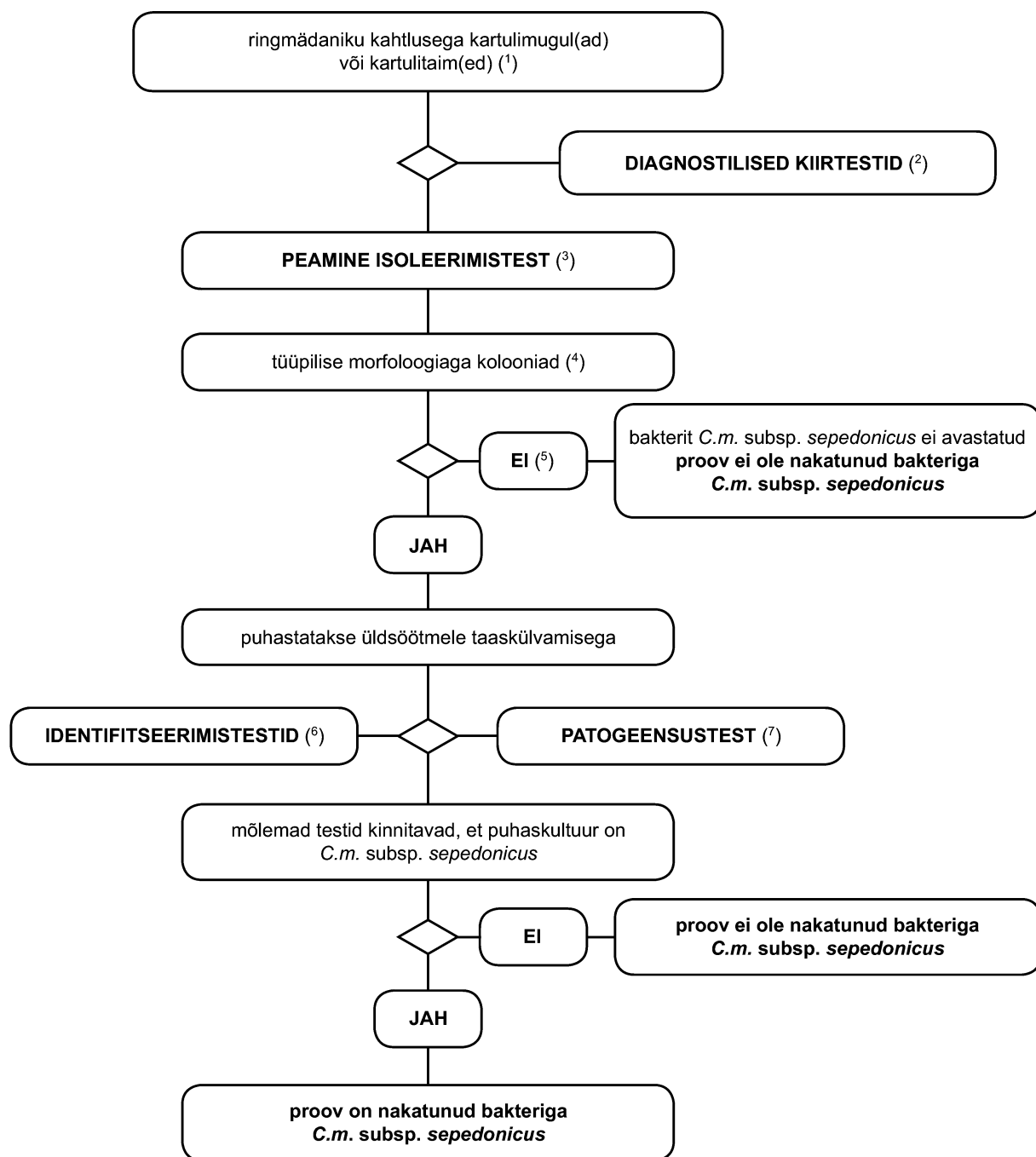
Kui esimene sõelkatse (IF või PCR/FISH) on positiivne, kahtlustatakse nakatumist bakteriga ja tuleb teha teine sõelkatse. Kui teine sõelkatse on positiivne, on kahtlus leidnud kinnituse (haiguse esinemise kahtlus) ning tuleb jätkata analüüside tegemist vastavalt metoodikale. Kui teine sõelkatse on negatiivne, ei peeta proovi bakteriga nakatunuks.

Seetõttu on artikli 4 lõikes 2 osutatud positiivne IF-analüüs määratletud teises sõelkatses (PCR/FISH) kinnitust leidnud positiivse IF-tulemuse kaudu.

Direktiivi 93/85/EMÜ artikli 5 lõikes 1 osutatud kinnitatud organismi olemasolu tähendab bakteri *C. m.* subsp. *sepedonicus* puhaskultuuri isoleerimist ja identifitseerimist koos patogeensuse kinnitusega.

1. PROTSESSI TUTVUSTUS DIAGRAMMINA**1.1. avastusmetoodika ringmädaniku diagnoosimiseks ringmädaniku sümptomitega kartulimugulates ja -taimedes**

Analüüsimeetoodika on ette nähtud kartulimugulate ja -taimede puhul, millel esinevad tüüpilised või kahtlased ringmädaniku sümptomid. Siia kuuluvad kiiranalüüs, saastunud juhtkoest patogeeni isoleerimine diagnostilisele söötmele ja positiivse tulemuse korral bakterikultuuri *C. m.* subsp. *sepedonicus* kindlaksmääramine.



⁽¹⁾ Sümptomite kirjeldus on esitatud punktis 2.

⁽²⁾ Asjakohased analüüsid on järgmised:
— IF-analüüs (punkt 4),
— PCR-analüüs (punkt 6),
— FISH-analüüs (punkt 5).

⁽³⁾ Kuigi esmaseks sammuks on tüüpiliste sümptomitega taimsest materjalist haigusetekiata isoleerimine kasvusöötmeplaatidele, võib selline kultiveerimine ebaõnnestuda infektsiooni edasiarenenud faaside korral. Saprofüütsed bakterid, mis kasvavad haigestunud kudedel, võivad isoleerimissöötmele haigusetekiata kasvu maha suruda. Seetõttu on soovitatav kasutada nii mitteselektiiv- kui selektiivsöödet, eelistatavalt MTNAd (punkt 8) või biotesti (punkt 7).

⁽⁴⁾ Tüüpilise koloonia morfoloogia kirjeldus on esitatud punktis 8.

⁽⁵⁾ Kui bakteri isoleerimine annab negatiivse tulemuse, kuid haiguse sümptomid on tüüpilised, tuleb isoleerimist korrata.

⁽⁶⁾ Bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* puhaskultuuri saab usaldusväärselt kindlaks määrata, kasutades punktis 9 loetletud analüüse.

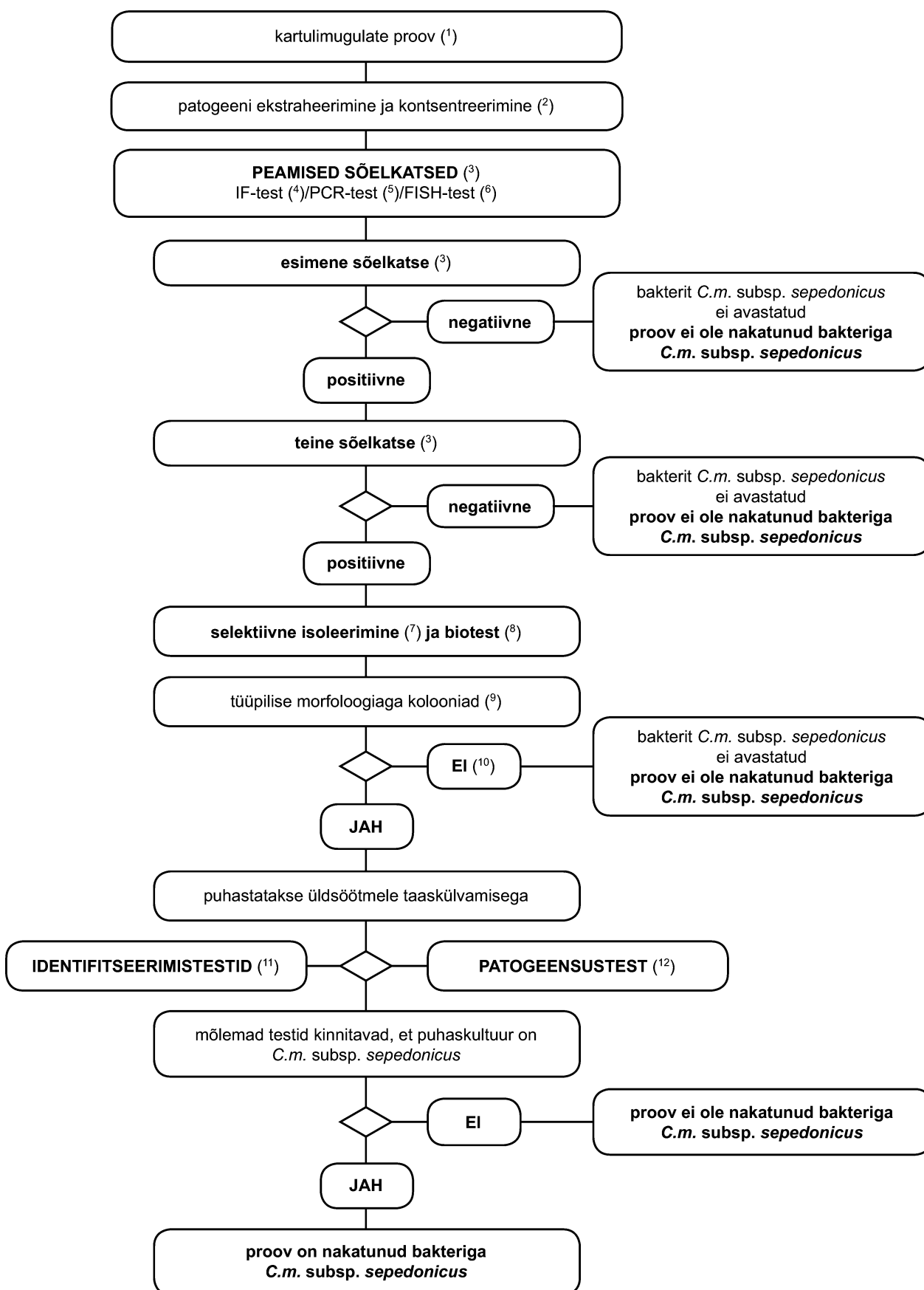
⁽⁷⁾ Patogeensusanalüüsi on kirjeldatud punktis 10.

1.2. **Bakteri *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* asümptomaatiliste kartulimugulate proovides avastamise ja kindlaksmääramise meetodika**

Põhimõte

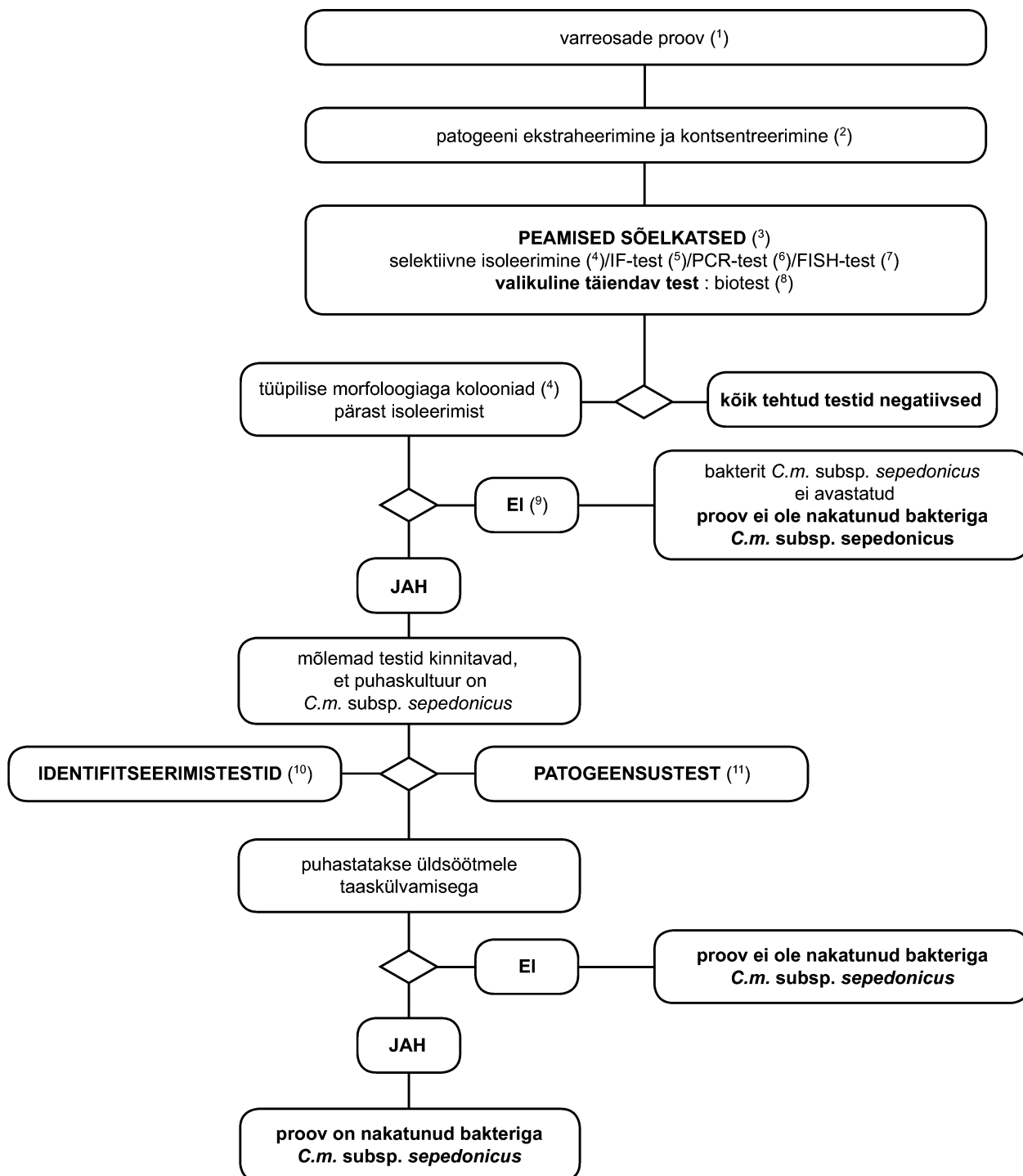
Analüüsimeetod on mõeldud latentsete nakkuste avastamiseks kartulimugulates. Erinevatel bioloogilistel põhimõtetel põhineva vähemalt kahe sõelkatse positiivse tulemuse korral tuleb patogeeni isoleerida; kui isoleeritakse tüüpilised kolooniad, peab järgnema bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* puhaskultuuri kindlaksmääramine. Ainult ühe sõelkatse positiivsest tulemusest ei piisa selleks, et lugeda proov kahtlaseks.

Sõelkatsed ja isolatsioonianalüüsid peavad võimaldama avastada 10^3 kuni 10^4 rakku resuspendeeritud bakterisademe milliliitri kohta, mis kuuluvad positiivse kontrollina igasse analüüsiseeriasse.



- (¹) Standardproovi suurus on 200 mugulat, kuid meetodit saab kasutada väiksema prooviga, kui 200 mugulat ei ole.
- (²) Patogeeni eraldamise ja kontsentreerimise meetodeid on kirjeldatud punktis 3.1.
- (³) Kui erinevatel bioloogilistel põhimõtetel põhinevad vähemalt kaks analüüsi annavad positiivse tulemuse, tuleb bakter isoleerida ja kinnitada. Tehakse vähemalt üks sõelkatse. Kui selle katse tulemus on negatiivne, loetakse proov negatiivseks. Kui selle katse tulemus on positiivne, tuleb teha üks või mitu erinevatel bioloogilistel põhimõtetel põhinevat sõelkatset esimese positiivse tulemuse tõendamiseks. Kui teise või järgmiste katsete tulemused on negatiivsed, loetakse proov negatiivseks. Täiendavad analüüsi ei ole vaja teha.
- (⁴) Immunofluorestsentsanalüüs (IF).
IF-sõelkatses kasutatakse alati polükloonilist antikeha, monokloonilised lisaantikehad võivad anda konkreetsema tulemuse (vt punkti 4).
- (⁵) PCR-analüüs.
Kasutatakse nõuetekohaselt valideeritud PCR-reaktiive ja -protokolle (vt punkti 6).
- (⁶) FISH-analüüs.
Kasutatakse valideeritud reaktiive ja protokolle (vt punkti 5).
- (⁷) Selektiivne isoleerimine.
MTNA-kasvusöötmel või NCP-88-kasvusöötmel ja 1/100 lahjendatud resuspendeeritud bakterisademe kasutamisel võib see paljudel juhtudel olla sobiv meetod bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* otseseks eraldamiseks. Tüüpilised kolooniad võivad ilmuda 3–10 päeva möödumisel külvamisest. Seejärel saab patogeeni puhastada ja kindlaks määrata. Selle analüüsi kogu potentsiaali kasutamiseks tuleb väga hoolikalt eemaldada kartulitelt basaalse tipu südamikud, et vältida kartulimugulates sekundaarseid baktereid, mis on bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* konkurendid kasvusöötmel ning võivad mõjutada haigusetehtaja kasvu. Kui see analüüs ei õnnestu, tuleb bakterid eraldada biotestiks kasutatavatest taimedest (vt punkti 8).
- (⁸) Biotesti kasutatakse bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* isoleerimiseks kartuliekstrakti bakterisademest selektiivse rikastamise teel baklažaanides (*Solanum melongena*). Katse tegemiseks on vaja käesolevas meetodis määratletud optimaalseid kasvutingimusi. Seda katset ei mõjuta tõenäoliselt bakterid, mis inhibeervad bakterit *C. m. subsp. sepedonicus* MTNA- või NCP-88-kasvusöötmel (vt punkti 7).
- (⁹) Tüüpilise koloonia morfoloogia kirjeldus on esitatud punktis 8.
- (¹⁰) Saprofüütbakterid võivad olla konkurendiks või inhibiitoriks ja selle tõttu võib kasvatamine või biotest ebaõnnestuda. Kui sõelkatsed on andnud positiivseid tulemusi, kuid isoleerimisanalüüsid on negatiivsed, korraldatakse isoleerimisanalüüsi sama bakterisademega või võetakse lisaks sama proovi lõigatud mugulate basaalse tipu juurest juhtkudet ning vajaduse korral tehakse analüüsi lisaproovidega.
- (¹¹) Bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* eeldatava puhaskultuuri saab usaldusväärselt kindlaks määrata, kasutades punktis 9 kirjeldatud analüüsi.
- (¹²) Patogeensusanalüüsi on kirjeldatud punktis 10.

- 1.3. haigusetekitaja *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* asümptomaatiliste kartulitaimede proovides avastamise ja kindlaksmääramise meetodika



- (¹) Soovitavad proovide suurused on punktis 3.2.
- (²) Patogeeni ekstraheerimise ja kontsentreerimise meetodeid on kirjeldatud punktis 3.2.
- (³) Kui vähemalt kaks erinevatel bioloogilistel põhimõtetel põhinevat analüüsi annavad positiivse tulemuse, tuleb bakter isoleerida ja kinnitada.
Tehakse vähemalt üks sõelkatse. Kui selle katse tulemus on negatiivne, loetakse proov negatiivseks. Kui selle katse tulemus on positiivne, tuleb teha üks või mitu erinevatel bioloogilistel põhimõtetel põhinevat sõelkatset esimese positiivse tulemuse tõendamiseks. Kui teise või järgmiste katsete tulemused on negatiivsed, loetakse proov negatiivseks. Täiendavad analüüsi ei ole vaja teha.
- (⁴) Selektiivset isoleerimisanalüüsi ja tüüpilise koloonia morfoloogiat on kirjeldatud punktis 8.
- (⁵) IF-analüüsi on kirjeldatud punktis 4.
- (⁶) PCR-analüüsi on kirjeldatud punktis 6.
- (⁷) FISH-analüüsi on kirjeldatud punktis 5.
- (⁸) Biotesti on kirjeldatud punktis 7.
- (⁹) Saprofüütbakterid võivad olla konkurendiks või inhibiitoriks ja selle tõttu võib kasvatamine või biotest ebaõnnestuda. Kui sõelkatsetega saadakse positiivseid tulemusi, kuid isoleerimisanalüüsid on negatiivsed, korratakse isoleerimisanalüüsi ja vajaduse korral tehakse neid lisaproovidega.
- (¹⁰) Bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* eeldatava puhaskultuuri saab usaldusväärselt kindlaks määrata, kasutades punktis 9 kirjeldatud analüüsi.
- (¹¹) Patogeensusanalüüsi on kirjeldatud punktis 10.

2. RINGMÄDANIKU SÜMPTOMITE VISUAALNE KONTROLL

2.1. Kartulitaimed

Euroopa kliimatingimustes leitakse sümptomeid põllul harva, tihti ilmnevad need alles hooaja lõpus. Lisaks sellele takistavad sageli sümptomite äratundmist muud haigused, lehtede vananemine või mehhaanilised vigastused. Seetõttu võivad sümptomid põllu kontrollimisel kergesti märkamata jääda. Närbumissümptomid on pruunmädaniku närbumissümptomitest väga erinevad; närbumine on tavaliselt aeglane ja piirdub alguses leheservadega. Noored nakatunud lehed kasvavad sageli edasi, kuid kasv on nakatunud leheosas aeglasem. Selle tulemusel on lehe kuju ebakorrapärane. Varre alaosas olevatel lehtedel, mida mõjutab varre juhtkudede sulgumine, on leheroodude vaheline ala sageli klorootiline, värvusega kollasest oranžini. Nakatunud lehekesed, lehed ja isegi varred võivad hävida. Lehed ja mugulad on sageli lihtsalt väiksemad. Mõnikord taimed kanguvad. Paljude sümptomite värvilised pildid on veebilehel <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

2.2. Kartulimugulad

Esimesed sümptomid on koe kerge klaasistumine või poolläbipaistvus ilma pehmenemiseta juhtkoe ümbruses, eriti basaalse tipu lähedal. Juhtkoering basaalses tipus võib olla veidi tumedama värvusega kui tavaliselt. Esimene kindlalt identifitseeritav sümptom on see, kui juhtkoering on kollaka värvusega ning kui mugula kergel pigistamisel ilmuvad soontest juustulaadse aine sambad. See eritis sisaldab miljoneid baktereid. Juhtkude võib muutuda pruunikaks ning selles etapis sarnanevad sümptomid mugulal pruunmädaniku sümptomitega, mida põhjustab *Ralstonia solanacearum*. Esialgu võivad need sümptomid olla üksnes ühes juhtkoeringi osas ning ei pruugi olla basaalse tipu lähedal ning võivad järk-järgult laieneda kogu ringile. Haiguse süvenedes juhtkude hävib; koore välimine osa võib eralduda sisemisest. Haiguse lõppjärgus ilmuvad mugula pinnale praod, mis on sageli äärtest punakaspruunid. Hiljuti on Euroopas olnud mitu juhtumit, kus koore keskosa mädaneb juhtkoeringiga üheaegselt, mille tulemuseks on sekundaarne invasioon koos sisemuse õõnsaks muutumise ja nekroosiga. Sekundaarse seenhaiguse või bakteri levik võib sümptomeid varjata ning lõppjärgus võib olla raske või isegi võimatu eristada ringmädaniku sümptomeid teistest mugulamädanikest. Võib esineda ebatüüpilisi sümptomeid. Paljude sümptomite värvilised pildid on veebilehel <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

3. PROOVI ETTEVALMISTAMINE

3.1. kartulimugulad

Märkus:

- Standardproovi suurus on 200 mugulat analüüsi kohta. Intensiivsem proovivõtmine eeldab rohkem analüüse, kuid proovi suurus jääb samaks. Suurem mugulate arv proovis põhjustab tulemuste inhibeerimise või nende tõlgendamise keerukuse. Siiski saab meetodit kasutada ka alla 200 mugulaga proovi puhul, kui rohkem mugulaid ei ole.
- Kõigi allpool kirjeldatud avastamismeetodite valideerimine põhineb analüüsidel, mis on tehtud 200 mugulast koosneva prooviga.
- Allpool kirjeldatud kartuliekstrakti saab kasutada ka kartuli pruun-baktermädaniku bakteri *Ralstonia solanacearum* avastamiseks.

Vabatahtlik eeltöötlemine enne proovi valmistamist:

Mugulad pestakse. Iga proovi järel kasutatakse kohaseid desinfektsioonivahendeid (klooriühendeid, kui kasutatakse PCR-analüüsi, et eemaldada võimalik patogeenne DNA) ja pesuaineid. Mugulad kuivatatakse õhu käes. Eriti on pesemine kasulik (kuid mitte kohustuslik) nende proovide puhul, millel on liiga palju mulda, ning kui tehakse PCR-analüüsi või bakterite otsest isoleerimist.

- 3.1.1. Puhta ja desinfitseeritud skalpelli või juurviljanoo abil eemaldatakse koor mugula basaalse tipu juurest nii, et juhtkude tuleb nähtavale. Basaalse tipu juures lõigatakse väike juhtkoe südamik ettevaatlikult välja nii, et muid kudesid tuleks kaasa võimalikult vähe (vt veebilehekülge <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Märkus:

Iga kahtlaste ringmädaniku sümptomitega mugul pannakse kõrvale ja analüüsitakse eraldi.

Kui basaalse tipusüdamiku eemaldamisel ilmneb kahtlaseid sümptomeid, tuleks teha selle mugula visuaalne kontroll pärast mugula lõikamist basaalse tipu juurest. Kõiki kahtlaste sümptomitega lõigatud mugulaid tuleks hoida korgistumiseks vähemalt kaks päeva toatemperatuuril ning seejärel säilitada jahutatud mugulad (4–10 °C) kohastes karantiinitingimustes, kuni kõik analüüsid on tehtud. Kõiki proovideks võetud mugulaid (sealhulgas kahtlaste sümptomitega mugulad) tuleks säilitada vastavalt II lisale.

- 3.1.2. Basaalsed tipusüdamikud kogutakse kasutamata ühekordse kasutusega mahutitesse, mida saab sulgeda ja/või pitseerida (kui mahuteid kasutatakse uuesti, tuleks need põhjalikult puhastada ja desinfitseerida, kasutades klooriühendeid). Eelistatult tuleks eemaldatud basaalseid tipusüdamikke töödelda kohe. Kui see ei ole võimalik, hoitakse neid mahutis puhvrit lisamata, jahutatult mitte üle 72 tunni või toatemperatuuril mitte üle 24 tunni. Ringmädaniku bakteri avastamist võivad takistada südamekuivamine ja korgistumine ning saprofüütide kasv ladustamise ajal.
- 3.1.3. Basaalseid tipusüdamikke töödeldakse, kasutades ühte järgmistest meetoditest.
- a) Südamikud kaetakse piisava koguse (umbes 40 ml) ekstraktsioonipuhvriga (3. liide) ja segatakse pöörleva loksutiga (50–100 pööret minutis) 4 tundi alla 24 °C juures või 16–24 tundi külmutatult.
- b) Südamikud homogeneeritakse piisava koguse (umbes 40 ml) ekstraktsioonipuhvriga (3. liide) kas segistis (näiteks Waring või Ultra Thurax) või purustatakse need suletud ühekordse kasutusega matseratsioonikotis (näiteks Stomacheri või Bioreba tugev kilekott mõõtudega 150 mm × 250 mm; kiirgussteriilne), kasutades kummivasarat või sobivat peenestusseadet (näiteks Homex).

Märkus:

Kui proovid homogeneeritakse segistis, on suur proovide ristsaastumise oht. Võetakse ettevaatusabinõusid, et vältida aerosooli tekkimist või proovi lekkimist ekstraktsiooni käigus. Tagatakse asja steriliseeritud segistiterade ja -anumate kasutamine iga proovi korral. Kui kasutatakse PCR-analüüsi, välditakse DNA ülekandumist mahutites või peenestusseadmes. PCR-analüüsi tegemisel on soovitatav purustada ühekordse kasutusega kottides ja kasutada ühekordse kasutusega katseklaase.

- 3.1.4. Supernatant dekanteeritakse. Kui lahus on liiga hägune, selgitatakse see madalal kiirusel tsentrifuugides (mitte üle 180 g 10 minuti jooksul temperatuuril 4–10 °C) või vaakumfiltrimisega (40–100 µm), pestes filtrit (10 ml) täiendava ekstraktsioonipuhvriga (3. liide).
- 3.1.5. Bakterifraktsioon kontsentreeritakse, tsentrifuugides 7 000 g juures 15 minutit (või 10 000 g juures 10 minutit) temperatuuril 4–10 °C ning supernatant eemaldatakse bakterisadet segamata.
- 3.1.6. Bakterisade resuspendeeritakse 1,5 ml bakterisademe puhvris (3. liide). Bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* analüüsiks kasutatakse 500 µl, bakteri *Ralstonia solanacearum* analüüsiks 500 µl ja võrdluseesmärgil 500 µl. 500 µl võrdlusalikvoodile ja ülejäänud analüüsialikvoodile lisatakse steriilset glütserooli lõppkontsentratsiooni 10–25 % (v/v) saamiseks, loksutatakse ja säilitatakse temperatuuril –16 kuni –24 °C (nädalaid) või –68 kuni –86 °C (kuid). Analüüside tegemise ajal hoitakse analüüsialikvoote 4–10 °C juures.

Korduv külmutamine ja sulatamine ei ole soovitatav.

Kui ekstrakti tuleb transportida, tuleb seda teha külmkapis 24–48 tunni jooksul.

- 3.1.7. Kõiki bakteri *C. m. subsp. sepedonicum* positiivseid kontrole ja proove käsitletakse eraldi, et vältida saastumist. Seda järgitakse IF-objektiklaaside ja kõigi analüüside korral.

3.2. Kartulitaimed

Märkus:

Bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* latentsete populatsioonide avastamiseks on soovitatav kasutada liitproove. Meetodit saab mugavalt kasutada kuni 200 varreosast koosnevate liitproovide puhul. (Seirete läbiviimisel peaksid seired põhinema uuritavat taimepopulatsiooni statistiliselt esindaval proovil.)

- 3.2.1. Iga varre alaosa, maapinna kohalt, eemaldatakse desinfitseeritud noa või oksakääridega 1–2 cm pikkune osa.

Varreosad desinfitseeritakse kergelt 70 % etanooliga ja kuivatakse kohe kuivatuspaberiga.

Varreosad kogutakse suletud steriilsesse mahutisse järgmise proovivõtumenetluse kohaselt.

3.2.2. Varreosad töödeldakse, kasutades ühte järgmistest meetoditest.

- a) Varreosad kaetakse piisava koguse (umbes 40 ml) ekstraktsioonipuhvriga (3. liide) ja segatakse pöörleval lok-sutil (50–100 pöört minutis) 4 tundi alla 24 °C juures või 16–24 tundi külmutatult.
- b) Töödeldakse kohe, purustades osad tugevas matseratsioonikotis (näiteks Stomacher või Bioreba) koos sobiva koguse ekstraktsioonipuhvriga (3. liide) kas kummivasara või kohase peenestusseadmega (näiteks Homex). Kui see ei ole võimalik, säilitatakse varreosad jahutatult mitte üle 72 tunni või toatemperatuuril mitte üle 24 tunni.

3.2.3. Kui lahus on seisnud 15 minutit, dekanteeritakse supernatant.

3.2.4. Ekstrakti täiendavat selitamist või bakterifraktsiooni kontsentreerimist tavaliselt ei nõuta, kuid seda võib teha, fil-treerides või tsentrifuugides vastavalt punktidele 3.1.4–3.1.6.

3.2.5. Lahjendamata või kontsentreeritud proov jagatakse kahte võrdsesse ossa. Ühte osa säilitatakse 4–10 °C juures ana-lüüside tegemise ajal ja teist osa 10–25 % (v/v) steriilse glütserooliga temperatuuril – 16 kuni – 24 °C (nädalaid) või – 68 kuni – 86 °C (kuid) juhuks, kui on vaja teha täiendavaid analüüse.

4. IF-ANALÜÜS

Põhimõte

IF-analüüsi tegemist peamise sõelkatsena soovitatakse sellepärast, et see annab stabiilseid tulemusi nõutavate piir-väärtuste raames.

Kui peamise sõelkatsena kasutatakse IF-analüüsi ja IF-tulemus on positiivne, tuleb teise sõelkatsena teha PCR- või FISH-analüüs. Kui IF-analüüsi kasutatakse teise sõelkatsena ja IF-tulemus on positiivne, tuleb analüüsi lõpuleviimi-seks teha vastavalt diagrammile täiendavaid analüüse.

Märkus:

Kui peamise sõelkatsena kasutatakse IF-analüüsi, kasutatakse alati polükloonsed antikeha. Positiivse IF-tulemuse korral polükloonsed antikehaga võib proovi täiendav analüüsimine monokloonsed antikehaga anda täpsemaid tulemusi, kuid need võivad olla vähem tundlikud.

Kasutatakse bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* referentttüve antikehasid. On soovitatav määrata iga uue antikehapartii tiiter. Tiiter on kõrgeima kontsentratsiooniga lahus, mille juures toimub optimaalne reaktsioon, kui tehakse analüüsi suspensiooniga, mis sisal-dab 10^3 kuni 10^6 bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* homoloogse tüve rakku milliliitris, ja kasutatakse kohast fluorestseinsotiootsüa-naadi (FITC) konjugaati vastavalt tootja soovitudele. Lahjendamata polükloonsed või monokloonsed antikehade IF-tiiter peaks olema vähemalt 1: 2 000. Analüüside käigus tuleks kasutada antikehade töölahjendust (töölahjendusi), mis on tiitri lähedal või sellega võrdsed. Kasutatakse valideeritud antikehasid (vt veebilehekülge <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Analüüs tuleks teha äsja valmistatud prooviekstraktidega. Vajaduse korral saab seda edukalt teha ekstraktidega, mida on säilitatud – 68 kuni – 86 °C juures glütserooli all. Glütserooli saab proovist eemaldada nii, et lisatakse 1 ml bakterisademe puhvrit (4. liide), tsentrifuugitakse uuesti 15 minutit 7 000 g juures ja resuspendeeritakse bakterisademe puhvriga võrdsesse mahtu. Seda ei ole tihti tarvis, eriti siis, kui proovid fikseeritakse objektiklaasidele, kuumutades klaase läbi leegi (vt punkti 2.2).

Valmistatakse vastavalt 2. liitele kartuliekstraktis ja soovi korral puhvril suspendeeritud bakteri *C. m. subsp. sepe-donicus* homoloogse tüve või mis tahes muu referentttüve eraldi positiivsed kontrollobjektiklaasid.

Võimaluse korral tuleks kasutada looduslikult nakatunud kudet (mida on säilitatud lüofiliseerituna või külmuta-tuna – 16 kuni – 24 °C juures) samalaadseks kontrolliks samal objektiklaasil.

		Resuspendeeritud bakterisademe lahjendused					
		1/100	1/1	1/1	1/1	1/1	☐ Resuspendeeritud bakterisademe lahjendus
(T = tiiter)		T/2	T/4	T/2	T	2T	☐ Antiseerumi/anti-keha kahekordsed lahjendused
Proov 1							
Proovi 1 duplikaat või proov 2							

Joonis 2. Analüüsi objektiklaaside valmistamine vastavalt punkti 4.1 alapunktile ii ja punkti 4.3 alapunktile ii.

Antiseerumi/antikeha töölahjendused					
	1/1	1/10	1/100	tühi	tühi
Proov 1					
Proovi 1 duplikaat või proov 2					

☐ Resuspendeeritud bakterisademe kümnendlahjendused

- 4.3.1. Objektiklaasid asetatakse niiskele paberile. Iga aknaväli kaetakse täielikult antikeha lahjendus(t)ega. Igale aknaväljale lisatud antikeha kogus peab olema vähemalt võrdne objektiklaasile lisatud ekstrakti kogusega.

Kui antikehade tarnijatelt ei ole konkreetseid juhiseid, tuleks kasutada järgmist meetodit.

- 4.3.2. Objektiklaase inkubeeritakse niiskel paberil katte all 30 minutit ümbritseva õhu temperatuuril (18–25 °C).
- 4.3.3. Igalt objektiklaasilt raputatakse piisad ära ja need loputatakse hoolikalt IF-puhvriga. Pestakse 5 minutit IF Tween-puhvril (3. liide) ning seejärel 5 minutit IF-puhvril. Vältitakse aerosoolide tekkimist ja piiskade ülekandmist, mis võiks põhjustada ristisaastumise. Kuivatuspaberiga kergelt kuivatades eemaldatakse ettevaatlikult liigne niiskus.
- 4.3.4. Objektiklaasid asetatakse niiskele paberile. Aknaväljad kaetakse FITC-konjugaadi lahjendusega, mida kasutati tiitri määramisel. Aknaväljadele lisatud konjugaadi kogus peab olema sama, mis on kasutatud antikeha kogus.
- 4.3.5. Objektiklaase inkubeeritakse niiskel paberil katte all 30 minutit ümbritseva õhu temperatuuril (18–25 °C).
- 4.3.6. Konjugaadi tilgad raputatakse objektiklaasilt maha. Loputatakse ja pestakse nagu eespool kirjeldatud (punkt 4.3.3).

Eemaldatakse ettevaatlikult liigne niiskus.

- 4.3.7. Igasse aknavälja pipetatakse 5–10 µl 0,1 M fosfaatpuhverdatud glütserooli (3. liide) või müügil olevat fluorestseerumise tuhmumise vastast kattevedelikku ning objektiklaas kaetakse katteklasisga.

4.4. IF-analüüsi tulemused

- 4.4.1. Objektiklaase vaadeldakse mikroskoobis, millele on paigaldatud epifluorestsentsvalgusallikas ja sobilikud filtrid tööks FITCga, ning kasutatakse õli- või vesiimmersiooni suurendusel 500 – 1 000 korda. Aknavälju vaadeldakse risti läbi kahe diameetri täisnurga suhtes ja ümber aknavälja välisääre. Proovide puhul, kus ei paista üldse või paistab ainult väga vähe rakke, vaadeldakse vähemalt 40 mikroskoobi vaatevälja.

Esialgu kontrollitakse positiivset kontrollobjektiklaasi. Rakud peavad eredalt fluorestseeruma ja olema täielikult värvunud kindlaksmääratud antikehade tiitris või töölahjenduses. Kui värvumine ei ole täielik, tuleb IF-analüüsi (punkt 4) korrata.

- 4.4.2. Vaadeldakse bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* iseloomuliku morfoloogiaga eredalt fluorestseeruvaid rakke objektiklaaside aknaväljades (vt veebilehekülge <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Fluorestseerumise intensiivsus peaks olema sama antikeha lahjenduse juures positiivse kontrolltöö fluorestseerumise intensiivsusega võrdne või sellest parem. Lõplikult värvumata või nõrgalt fluorestseeruvad rakud jäetakse kõrvale.

Mis tahes saastumiskahtluse korral tuleb analüüsi korrata. Näiteks siis, kui partii kõigil objektiklaasidel on positiivseid rakke puhvri saastumise tõttu või kui leitakse positiivseid rakke objektiklaasi pinnal (väljaspool aknavälju).

- 4.4.3. Immunofluorestsentsanalüüsi spetsiifilisuse tõttu on mitmeid probleeme. Kartuli basaalse tipusüdamiku ja varreosa bakterisademetes ilmuvad tõenäoliselt ebatüüpilise morfoloogiaga fluorestseeruvate rakkude taustpopulatsioonid ning bakteriga *C. m. ssp. sepedonicus* sama suuruse ja morfoloogiaga ristuvast reageerivad saprofüütbakterid.

4.4.4. Arvesse võetakse ainult tüüpilise suuruse ja morfoloogiaga fluorestseeruvaid rakke punktis 4.3 esitatud antikeha tiitris või töölahjenduses.

4.4.5. IF-tulemuste tõlgendamine:

- i) Kui esineb morfoloogiliselt tüüpilisi eredalt fluorestseeruvaid rakke, määratakse keskmine tüüpiliste rakkude arv mikroskoobi vaatevälja kohta ja arvutatakse tüüpiliste rakkude arv (N) resuspendeeritud bakterisademe milliliitris (4. liide).

Proovi IF-tulemus on positiivne, kui seal on vähemalt 5×10^3 tüüpilist rakku resuspendeeritud bakterisademe milliliitris. Proovi loetakse saastumiskahtlusega prooviks ning tuleb teha lisaanalüüse.

- ii) Proovi IF-tulemus on negatiivne, kui seal on alla 5×10^3 rakku resuspendeeritud bakterisademe milliliitris, ning proov loetakse negatiivseks. Lisaanalüüse ei ole vaja teha.

5. FISH-ANALÜÜS

Põhimõte

Kui esimese sõelkatsena kasutatakse FISH-analüüsi ja tulemus on positiivne, tuleb teise kohustusliku sõelkatsena teha IF-analüüs. Kui FISH-analüüsi kasutatakse teise sõelkatsena ja tulemus on positiivne, tuleb lõpliku diagnoosi panemiseks teha vastavalt diagrammile täiendavaid analüüse.

Märkus:

Kasutatakse ainult valideeritud bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* spetsiifilisi oligoproove (7. liide). Eelanalüüsid sellel meetodil peaksid võimaldama reprodutseeritavalt avastada varem negatiivse tulemuse andnud prooviekstraktidele lisatud vähemalt 10^3 kuni 10^4 bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* rakku milliliitris.

Järgmist meetodit tuleks eelistatavalt kasutada äsja valmistatud prooviekstraktiga, kuid seda võib edukalt kasutada ka prooviekstraktiga, mida on säilitatud glütserooli all temperatuuril -16 kuni -24 °C või -68 kuni -86 °C.

Negatiivse kontrollina kasutatakse sama proovi alikvoote, mis andsid varem bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* osas negatiivse tulemuse.

Positiivseteks kontrollideks valmistatakse 3–5 päeva vanusest kultuurist (valmistamist vt 2. liitest) bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* (näiteks tüvi NCPPB 4053 või PD 406) suspensioonid, mis sisaldavad 10^5 kuni 10^6 rakku milliliitri kohta 0,01 M fosfaatpuhvrts. Valmistatakse vastavalt 2. liitele kartuliekstraktis suspendeeritud bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* homologse tüve või mis tahes muu referenttüve eraldi positiivsed kontrollobjektiklaasid.

FITC-värvainega konjugeeritud eubakteriaalsete oligoproovide kasutamine võimaldab kontrollida hübriidsatsiooni protsessi, sest see värvib kõik proovis olevad eubakterid.

Kontrollmaterjali analüüsitakse samamoodi kui proovi (proove).

5.1. Kartuliekstrakti fikseerimine

Järgmine protokoll põhineb allikal Wullings *et al.*, (1998).

5.1.1. Valmistatakse kinnitilahus (vt 7. liidet).

5.1.2. Igast prooviekstraktist pipetatakse 100 µl Eppendorfi topsi ja tsentrifuugitakse 8 minutit 7 000 g juures.

5.1.3. Eemaldatakse supernatant ja bakterisade vedeldatakse 500 µl kinnitis, mis valmistati kuni 24 tundi varem. Loksutatakse vorteksil ja inkubeeritakse öö jooksul 4 °C juures.

Alternatiivseks kinnitik on 96 % etanool. Selle kasutamiseks vedeldatakse punkti 5.1.2 bakterisade 50 µl 0,01 M fosfaatpuhvrts ja 50 µl 96 % etanoolis. Loksutatakse vorteksil ja inkubeeritakse 4 °C juures vähemalt 30–60 minutit.

- 5.2.10. Objektiklaaside alus pannakse 1/2 hybmix-pesulahusesse ja inkubeeritakse veel 15 minutit.
- 5.2.11. Objektiklaasid kastetakse lühidalt ultrapuhtasse vette ja pannakse filterpaberile. Eemaldatakse liigne niiskus, kat-tes pinna õrnalt filterpaberiga. Igale aknaväljale pipetatakse 5–10 µl fluorestseerumise tuhmumise vastast katteve-delikku (näiteks Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA või samaväärne) ja üle terve objektiklaasi pannakse suur katteklaas (24 × 60 mm).

5.3. FISH-analüüsi tulemused

- 5.3.1. Objektiklaase vaadeldakse viivitamatult mikroskoobis, millele on paigaldatud epifluorestsentsvalgusallikas, ja kasu-tatakse õliimmersiooni suurendusel 630 või 1 000 korda. Fluoresteinisisototsüanaadile (FITC) sobiva filtriga vär-vuvad proovis olevad eubakterite rakud (sealhulgas enamik gramnegatiivseid rakke) fluorestseeruvroheliseks. Kasutades tetrametüülrödamiin-5-isototsüanaadile sobivat filtrit, paistavad bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* Cy3-ga värvunud rakud fluorestseeruvpunastena. Raku morfoloogiat võrreldakse positiivsete kontrollidega. Rakud pea-vad eredalt fluorestseeruma ja olema täielikult värvunud. Kui fluorestseerumine ei ole täielik, tuleb FISH-analüüsi (punkt 9.4) korrata. Aknavälju vaadeldakse risti läbi kahe diameetri täisnurga suhtes ja ümber aknavälja välisääre. Proovide puhul, kus ei paista üldse või paistab ainult väga vähe rakke, vaadeldakse vähemalt 40 mikroskoobi vaatevälja.
- 5.3.2. Vaadeldakse bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* iseloomuliku morfoloogiaga eredalt fluorestseeruvaid rakke objektiklaa-side aknaväljades (vt veebilehekülge <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Fluorestseerumise intensiivsus peab olema positiivse kontrolli fluorestseerumise intensiivsusega võrdne või sellest parem. Lõplikult värvumata või nõrgalt fluorestseeruvad rakud jäetakse kõrvale.
- 5.3.3. Mis tahes saastumiskahtluse korral tuleb analüüsi korrata. Näiteks siis, kui partii kõigil objektiklaasidel on posi-tiivseid rakke puhvri saastumise tõttu või kui leitakse positiivseid rakke objektiklaasi pinnal (väljaspool aknavälju).
- 5.3.4. FISH-analüüsi spetsiifilisuse tõttu on mitmeid probleeme. Kartuli basaalse tipusüdamiku ja varreosa bakterisade-metes võib esineda ebatüüpilise morfoloogiaga fluorestseeruvate rakkude taustpopulatsioone ning bakteriga *C. m. subsp. sepedonicus* sama suuruse ja morfoloogiaga ristuvalt reageerivaid saprofüütbaktereid, kuigi palju harvem kui IF-analüüsis.
- 5.3.5. Arvesse võetakse üksnes tüüpilise suuruse ja morfoloogiaga fluorestseeruvaid rakke, vt punkti 5.3.2.
- 5.3.6. FISH-analüüsi tulemuse tõlgendamine
- i) FISH-analüüsi valiidset tulemused saadakse siis, kui FITC-filtrit kasutades vaadeldakse bakterile *C. m. subsp. sepedonicus* omase suuruse ja tüüpilise morfoloogiaga ererohelisi fluorestseeruvaid rakke ja rodamiinfiltrit kasutades erepunaseid fluorestseeruvaid rakke kõigis positiivsetes kontrollides ja mitte üheski negatiivses kontrollis. Kui objektiklaasi aknaväljal esineb morfoloogiliselt tüüpilisi eredalt fluorestseeruvaid rakke, mää-ratakse keskmine rakkude arv mikroskoobi vaatevälja kohta ja arvutatakse tüüpiliste rakkude arv (N) resus-pendeeritud bakterisademe milliliitris (4. liide). Saastumiskahtlusega proovideks loetakse proove, milles on vähemalt 5×10^3 tüüpilist rakku resuspendeeritud bakterisademe milliliitris. Tuleb teha täiendavaid analüü-se. Proove, milles on alla 5×10^3 tüüpilise raku resuspendeeritud bakterisademe milliliitris, loetakse negatiivseteks.
 - ii) FISH-analüüs on negatiivne siis, kui rodamiinfiltrit kasutades ei vaadelda bakterile *C. m. subsp. sepedonicus* omase suuruse ja tüüpilise morfoloogiaga erepunaseid fluorestseeruvaid rakke, tingimusel et rodamiinfiltrit kasutades vaadeldakse erepunaseid fluorestseeruvaid rakke positiivsete kontrollide preparaates.

6. PCR-ANALÜÜS

Põhimõtted

Kui peamise sõelkatsena kasutatakse PCR-analüüsi ja tulemus on positiivne, tuleb teise kohustusliku sõelkatsena teha IF-analüüs. Kui PCR-analüüsi kasutatakse teise sõelkatsena ja tulemus on positiivne, tuleb lõpliku diagnoosi panemiseks teha vastavalt diagrammile täiendavaid analüüse.

Selle meetodi kasutamist peamise sõelkatsena soovitatakse ainult siis, kui on olemas eriteadmised.

Märkus:

Eelanalüüsid sellel meetodil peaksid võimaldama reprodutseeritavalt avastada varem negatiivse tulemuse andnud prooviekstraktidele lisatud 10^3 kuni 10^4 bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* rakku milliliitris. Maksimaalse tundlikkuse ja spetsiifilisuse saavutamiseks kõigis laborites võib olla vajalik teha optimeerimisanalüüse.

Kasutatakse valideeritud PCR-reaktiive ja -protokolle. Eelistatavalt valitakse sisekontrolliga meetod.

Proovi saastumise vältimiseks sihtmärk-DNAga kasutatakse kohaseid ettevaatusabinõusid. PCR-analüüsi peaksid tegema kogenud tehnikud spetsiaalsetes molekulaarbioloogia laborites, et minimeerida sihtmärk-DNAga saastumise võimalust.

Negatiivseid kontrole (DNA ekstraheerimise ja PCR-protseduurid) tuleks alati käsitleda menetluses viimaste proovidena, et kontrollida, kas on toimunud DNA ülekandmist.

PCR-analüüsis peaksid olema järgmised negatiivsed kontrollid:

- prooviekstrakt, mis andis varem bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* osas negatiivse tulemuse,
- kontrollpuhvrid, mida kasutati bakterite ja DNA eraldamisel proovist,
- PCR-reaktsioonisegu.

Tuleks kasutada järgmisi positiivseid kontrole:

- resuspendeeritud bakterisademetes alikvoodid, millele on lisatud bakterit *C. m. subsp. sepedonicus* (valmistamist vt 2. liitest),
- virulentsest isolaadist (näiteks NCPPB 2140 või NCPPB 4053) bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* vesisuspensioon (10^6 rakku milliliitris),
- võimaluse korral kasutatakse PCR-analüüsis ka positiivsetest kontrollproovidest saadud DNA-d.

Võimaliku saastumise vältimiseks valmistatakse positiivsed kontrollid analüüsivatest proovidest eraldi keskkonnas.

Prooviekstraktid peaksid olema võimalikult mullavabad. Seepärast on teataval juhudel soovitatav valmistada ekstraktid pestud kartulitest, kui soovitakse kasutada PCR-protokolle.

6.1. DNA puhastamismeetodid

Kasutatakse eespool kirjeldatud positiivseid ja negatiivseid kontrollproove.

Kontrollmaterjal valmistatakse samamoodi kui proov (proovid).

Sihtmärk-DNA eraldamiseks komplekssetest prooviainetest on võimalik kasutada erinevaid meetodeid, mille käigus eemaldatakse PCRi inhibiitorid ja muud ensümaatilised reaktsioonid ning kontsentreeritakse prooviekstraktis sihtmärk-DNA.

Järgmist meetodit on optimeeritud 6. liites esitatud valideeritud PCR-meetodiga kasutamiseks.

6.1. a) Pastriki (2000) meetod:

1. Pipetatakse 220 µl lüüsipuhvrit (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) 1,5 ml Eppendorfi topsi.
2. Lisatakse 100 µl prooviekstrakti ja pannakse 10 minutiks kuumutusplokile või vesivanni 95 °C juures.
3. Tops pannakse 5 minutiks jääle.
4. Lisatakse 80 µl lüüsiühümi põhilahust (50 mg lüüsiühümi ml kohta 10 mM Tris HCl-is, pH 8,0) ja inkubeeritakse 30 minutit 37 °C juures.
5. Lisatakse 220 µl Easy DNA[®] lahust A (Invitrogen), segatakse hästi vorteksil ja inkubeeritakse 30 minutit 65 °C juures.

6. Lisatakse 100 µl Easy DNA[®] lahust A (Invitrogen), loksutatakse tugevalt vorteksil, kuni sade valgub topsis vabalt ja proov on ühtlaselt viskoosne.
7. Lisatakse 500 µl kloroformi ning loksutatakse vorteksil viskoossuse kadumiseni ja homogeense segu saamiseni.
8. Faaside eraldamiseks ja interfaasi moodustamiseks tsentrifuugitakse 15 000 g juures 20 minutit temperatuuril 4 °C.
9. Ülemine faas kantakse üle puhtasse Eppendorfi topsi.
10. Lisatakse 1 ml 100 % etanooli (– 20 °C), segatakse lühidalt ja inkubeeritakse jääl 10 minutit.
11. Tsentrifuugitakse 20 minutit 15 000 g juures temperatuuril 4 °C ja eemaldatakse etanool bakterisademest.
12. Lisatakse 500 µl 80 % etanooli (– 20 °C) ja segatakse, pöörates topsi põhjaga ülespoole.
13. Tsentrifuugitakse 10 minutit 15 000 g juures temperatuuril 4 °C, bakterisade hoitakse alles ja eemaldatakse etanool.
14. Bakterisademel lastakse kuivada õhu käes või DNA Speed Vac'i seadmes.
15. Bakterisade resuspendeeritakse 100 µl steriilses ultrapuhtas vees ja jäetakse toatemperatuuril seisma vähemalt 20 minutiks.
16. Säilitatakse – 20 °C juures kuni PCR-analüüsi tegemiseni.
17. Igasugune valge sade tsentrifuugitakse alla ja kasutatakse 5 µl supernatanti, mis sisaldab DNA-d PCR-analüüsi tarvis.

6.1. b) Muud meetodid

Võib kasutada muid DNA ekstraheerimise meetodeid (näiteks Qiagen DNeasy Plant Kit), eeldusel et need sama tõhusalt puhastavad välja DNA kontrollproovidest, mis sisaldavad 10^3 kuni 10^4 patogeeni rakku milliliitris.

6.2. PCR-analüüs

- 6.2.1. Valmistatakse ette PCR-analüüsi analüüsi- ja kontrollmaatriksid vastavalt valideeritud protokollile (6. liide). Valmistatakse proovi DNA ekstrakti üks kümnendlahjendus (1:10 ultrapuhtas vees).
- 6.2.2. Saastevabas keskkonnas valmistatakse kohane PCR-reaktsioonisegu vastavalt avaldatud protokollile (6. liide). Valideeritud PCR-protokoll on mitmeetapiline reaktsioon, milles sisaldub ka sisemine PCR-kontroll.
- 6.2.3. Lisatakse 5 µl DNA ekstrakti 25 µl PCR-reaktsioonisegu kohta steriilsetes PCR-katseklaasides.
- 6.2.4. Võetakse ainult PCR-reaktsioonisegu sisaldav negatiivne kontrollproov ja proovi kohta lisatakse sama ultrapuhtast vett, mida kasutati PCR-segus.
- 6.2.5. Katseklaasid pannakse samasse termotsüklerisse, mida kasutati eelanalüüsi tegemisel, ning see pannakse tööle kohaselt optimeeritud PCR-programmis (6. liide).

6.3. PCR-produkti analüüs

- 6.3.1. PCR-amplikonid eraldatakse elektroforeesil agarosgeelis. Võetakse igast proovist vähemalt 12 µl amplifitseeritud DNA reaktsioonisegu, mis on segatud 3 µl täitepuhvriga (6. liide) 2,0 % (w/v) agarosgeelis trisatsetaat-EDTA (TAE) puhvris (6. liide) 5–8 V/cm. Kasutatakse kohast DNA markerit, näiteks 100 aluspaari redel.
- 6.3.2. DNA ribad tuuakse esile, värvides neid eetiumbromiidiga (0,5 mg liitris) 30–45 minutit, võttes kohaseid ettevaatusabinõusid selle mutageeni käitlemisel.
- 6.3.3. Värvunud geeli vaadeldakse lühilaine ultravioletvalgustusallikaga (näiteks $\lambda = 302$ nm) oodatava suurusega amplifitseeritud PCR-produktide (6. liide) leidmiseks ja need dokumenteeritakse.

- 6.3.4. Kõigi uute leidude/juhtumite korral tõendatakse PCR-amplikoni usaldatavust ülejäänud amplifitseeritud DNA proovi restriksiooniensüümi analüüsiga, inkubeerides optimaalsel temperatuuril ja aja jooksul kohase ensüümi ja puhvriga (vt 6. liidet). Lahustunud fragmendid eraldatakse elektroforeesil agarosgeelis nagu varem ja vaadeldakse pärast värvimist eetumbromiidiga ultraviolet-valgustusallikaga iseloomulikke restriksioonifragmendi pilti ning võrreldakse seda lahustamata ja lahustunud positiivse kontrolliga.

PCR-analüüsi tulemuse tõlgendamine

PCR-analüüs on negatiivne, kui kõnealuses proovis ei avastata bakterile *C. m. subsp. sepedonicus* spetsiifilist oodatava suurusega PCR-amplikoni, kuid see avastatakse kõigis positiivse kontrolli proovides (mitmeetapilise PCR-produkti puhul, millel on taimel spetsiifilised sisekontrolli praimerid: oodatava suurusega teist PCR-produkti tuleb amplifitseerida kõnealuse prooviga).

PCR-analüüs on positiivne, kui avastatakse bakterile *C. m. subsp. sepedonicus* spetsiifiline oodatava suuruse ja restriksioonipildiga (kui see on nõutav) PCR-amplikon, eeldusel et seda ei amplifitseeritud mõnest negatiivse kontrolli proovist. Positiivse tulemuse usaldusväärse kinnituse saab ka siis, kui analüüsi korratakse teiste PCR-praimeritega (punkt 9.3).

Märkus:

PCR inhibeerimist võib kahtlustada siis, kui oodatav amplikon saadakse positiivse kontrolli proovist, mis sisaldab bakterit *C. m. subsp. sepedonicus* vees, kuid negatiivseid tulemusi saadakse positiivsetest kontrollidest, mis sisaldavad bakterit *C. m. subsp. sepedonicus* kartuliekstraktis. Mitmekordsetes PCR-protokollides sisemiste PCR-kontrollidega viitab reaktsiooni inhibeerimisele see, kui ei saada kumbagi amplikoni.

Saastumist võib kahtlustada siis, kui oodatav amplikon saadakse ühest või mitmest negatiivsest kontrollist.

7. BIOTEST

Märkus:

Eelanalüüsid sellel meetodil peaksid võimaldama reprodutseeritavalt avastada varem negatiivse tulemuse andnud prooviekstraktidele lisatud 10^3 kuni 10^4 bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* kolooniat moodustavat üksust milliliitris (valmistamist vt 2. liitest).

Suurimat avastustundlikkust võib loota siis, kui kasutatakse äsja valmistatud prooviekstrakti ja optimaalseid kasvutingimusi. Meetodit saab siiski kasutada edukalt nende ekstraktidega, mida on säilitatud glütserooli all temperatuuril – 68 kuni – 86 °C.

Mõned baklažaanisordid on väga hea selektiivne rikastussööde bakteri *C. m. subsp. sepedonicum* kasvamiseks isegi sümptomite puudumisel ning ka peremeestaime kontrollanalüüsi jaoks.

Valede negatiivsete analüüsitulemuste riski vähendamiseks peaksid kasvutingimused olema optimaalsed.

Andmed kasvatamistingimuste kohta on 8. liites.

- 7.1. Punktidest 3.1.6 või 3.2.5 järelejäädud resuspendeeritud bakterisademe kogu analüüsialikvoot jagatakse baklažaanide vahel ühel allpool kirjeldatud meetodil (punkt 7.3 või 7.4). Kasutatakse ainult neid taimi, mis on 2–3 lehe faasis kuni kolmanda pärislehe täieliku väljakasvamiseni. Selleks et tagada resuspendeeritud bakterisademe täielik ärakasutamine ning tõhus inokulatsioon, on allpool kirjeldatud menetlusteks vaja 15–25 baklažaani proovi kohta.
- 7.2. Baklažaan ei kasteta 1–2 päeva enne inokulatsiooni, et vähendada raku siserõhku.
- 7.3. Inokulatsioon sisselõike kaudu
- 7.3.1. Taimi kahe sõrme vahel hoides pipetatakse suspendeeritud bakterisademe tilk (ligikaudu 5–10 µl) varrele idulehtede ja esimese lehe vahele.
- 7.3.2. Steriilse skalpelliga tehakse 1 cm pikkune diagonaalne sisselõige, mille sügavus on ligikaudu 2/3 varre paksusest, alustades sisselõiget bakterisademe tilga kohast.
- 7.3.3. Sisselõige kaetakse süstla abil steriilse vaseliiniga.

7.4. Inokulatsioon süstla abil

Baklažaanide varsi inokuleeritakse idulehtede kohalt hüpodermilise nõelaga süstlaga (vähemalt 23G). Proov jaotatakse baklažaanide vahel.

7.5. Positiivsete kontrollidena inokuleeritakse sama inokulatsioonimeetodiga (punkt 7.3 või 7.4) viis taime bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* teadaoleva kultuuri vesisuspensiooniga, milles on 10^5 kuni 10^6 rakku milliliitris, ja võimaluse korral looduslikul teel nakatunud mugula koega (vt punkti 4).

7.6. Negatiivse kontrollina inokuleeritakse sama inokulatsioonimeetodiga (punkt 7.3 või 7.4) viis taime steriilse bakterisademe puhvriga.

7.7. Taimi inkubeeritakse karantiiniruumides kuni neli nädalat temperatuuril 18–24 °C. Taimi inkubeeritakse piisava valguse ja suure niiskuse (70–80 %) juures ja neid kastetakse nii, et ära hoida ülekestmist või taimede närbumist veepuuduse tõttu. Bakteri *C. m. sepedonicus* rakud hävivad temperatuuril üle 30 °C ja optimaalne temperatuur on 21 °C. Saastumise vältimiseks inkubeeritakse positiivse kontrolli ja negatiivse kontrolli taimi selgelt eraldatud lavadel kasvuhoones või kasvukambris või, kui ruumi on vähe, tagatakse rangelt eraldi töötlemine. Kui erinevate proovide taimi tuleb inkubeerida lähestikku, eraldatakse need kohaste varjetega. Väetamisel, kastmisel, kontrollimisel ja mis tahes muude tegevuste juures pööratakse suurt tähelepanu ristsaastumise vältimisele. Oluline on puhastada kasvuhooned ja kasvukambrid kõigist putukkahjureist, sest need võivad kanda bakteri ühelt taimelt teisele.7.8. Sümptomeid kontrollitakse regulaarselt alates nädala möödumisest. Loetakse üle sümptomitega taimed. *C. m. subsp. sepedonicum* põhjustab baklažaanil lehtede närbumist, mis võib alata leheservade või leheroodude vahelise osa lõtvusena. Närbunud kude võib alguses olla tumeroheline või laiguline, kuid muutub kahvatumaks enne suremist. Leheroodude-vahelise ala närbunud kohad on rasvase ja lödise välimusega. Surnud koel on sageli ere kollane serv. Taimed ei pruugi hukkuda; mida pikem on periood enne sümptomite tekkimist, seda suurem on ellujäämise võimalus. Taimed võivad infektsioonist välja kasvada. Noored baklažaanid on palju vastuvõtlikumad bakteri *C. m. subsp. sepedonicum* väheste populatsioonide suhtes kui vanemad taimed, seepärast tuleb kasutada taimi 3. lehe faasis või vahetult enne seda.

Närbumist võivad põhjustada ka mugula koe bakterisademes olevate muude bakterite või seente populatsioonid. Need hõlmavad bakterite *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ja *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *Erwinia chrysanthemi*, *Phoma exigua* var. *foveata*, samuti saprofüütbakterite ulatuslikke populatsioone. Eelkõige võib *Erwinia chrysanthemi* põhjustada lehesümptomeid ja närbumist, mis on väga sarnased bakteri *C. m. sepedonicus* sümptomitega. Ainus erinevus on varre tumenemine bakteri *Erwinia chrysanthemi* infektsioonide korral. Muid närbumisi on võimalik eristada bakteri *C. sepedonicum* põhjustatud närbumisest, sest kõik lehed või taimed närbumad kiiresti. Võib teha ka värvimise Grami järgi: selle analüüsiga saab eristada baktereid *C. m. subsp. sepedonicus* ja *Erwinia* spp.

7.9. Niipea kui baklažaanidel ilmnevad sümptomid, tuleks teha uus isoleerimine, kasutades närbunud lehekoe osasid või taimede varrekudet (vt koe leotamist punktis 3.1.3). Baklažaanil lehed ja varred desinfitseeritakse pindmiselt, pühkides neid 70 % etanooliga. Baklažaanimahlagaga tehakse IF- või PCR-analüüsi ning isoleeritakse sobivale (selektiivsele) söötmele (vt punkti 8). Võib teha ka värvimise Grami järgi (9. liide). Bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* eeldatavad puhaskultuurid määratakse kindlaks ja kinnitatakse nende patogeensus (vt punkte 9 ja 10).7.10. Teatavatel tingimustel, eriti kui kasvutingimused ei ole optimaalsed, võib olla võimalik, et bakter *C. m. subsp. sepedonicus* eksisteerib varjatud nakkusena baklažaanis isegi pärast kuni nelja nädala pikkust inkubeerimist. Kui nelja nädala möödumisel sümptomeid ei ilmne, tehakse IF/PCR-analüüsid liitproovist, mis koosneb igalt katsetaimelt ülalpool inokulatsioonikohta võetud 1 cm varreosast. Kui analüüs on positiivne, tuleks teha uuesti isoleerimine sobival (selektiivsel) söötmel, kasutades punktis 8 kirjeldatud meetodit. Bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* eeldatavad puhaskultuurid määratakse kindlaks ja kinnitatakse nende patogeensus (punktid 9 ja 10).

Biotesti tulemuse tõlgendamine

Valiidsed biotesti tulemused saadakse siis, kui positiivsetel kontrolltaimedel on tüüpilised sümptomid, nendest taimedest saab uuesti isoleerida bakterid ja negatiivsetel kontrolltaimedel ei leita sümptomeid.

Biotesti tulemus on negatiivne, kui katsetaimed ei ole saastunud bakteriga *C. m. subsp. sepedonicus*, tingimusel et bakterit *C. m. subsp. sepedonicus* on avastatud positiivsetes kontrollides.

Biotest on positiivne, kui katsetaimed on nakatunud bakteriga *C. m. subsp. sepedonicus*.

8. BAKTERI *C. M. SUBSP. SEPEDONICUS* ISOLEERIMINE

Märkus:

Diagnoosi saab lõplikult panna ainult siis, kui bakter *C. m. subsp. sepedonicus* on isoleeritud, seejärel kindlaks määratud (vt punkti 9) ja kinnitatud patogeensusanalüüsiga (punkt 10). Kuigi *C. m. subsp. sepedonicus* on nõudlik organism, saab seda isoleerida sümptomaatilise koost.

Siiski võivad bakterist *C. m. subsp. sepedonicus* üle kasvada kiiresti kasvavad saprofüütbakterid ning seega on raske isoleerida otse mugula koe bakterisadest (punkt 3.1.6 või 3.2.5). Bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* otsene isoleerimine võib olla võimalik, kui kasutada selektiivsöödet ja kartuli basaalsestest tipusüdamikest või vartest saadud resuspendeeritud bakterisademe kohast lahjendust.

Isoleerimine tehakse kõigist sümptomitega kartulimugulatest või varreosadest ja baklažaanidest, millel ei ilmne sümptomeid, kuid mille liitproovi IF/PCR-analüüs oli positiivne (vt punkti 7.10). Baklažaanivarte leotamine tuleb vajaduse korral läbi viia vastavalt punktile 3.1.3.

Positiivsete kontrollidena valmistatakse ette kümnendlahjendused bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* (näiteks NCPPB 4053 või PD 406) suspensioonist, milles on 10^6 kolooniaid moodustavat osakest milliliitris. Igasuguse saastumise vältimiseks valmistatakse positiivsed kontrollid analüüsitava testproovidest täiesti eraldi.

Iga uuesti valmistatud selektiivsöötmepartii kõlblikkust patogeeni kasvatamiseks tuleks enne tavaproovide analüüsimist kontrollida.

Kontrollainet analüüsitakse samamoodi kui proovi (proove).

8.1. Selektiivsöötmel väljakülvamine

8.1.1. Kartuli resuspendeeritud bakterisademe või baklažaanimahla 100 µl alikvoodist tehakse bakterisademe puhvris kümnekordsed lahjendused (3. liide).

8.1.2. Kartuli lahjendamata bakterisadest isoleerimine tavaliselt ebaõnnestub, sest bakter *C. m. subsp. sepedonicus* on kasvutingimuste suhtes nõudlik ja saprofüüdid võistlevad sellega. Kuna bakter on tavaliselt suurte populatsioonidena nakatunud kudedes olemas, saab saprofüüdid tavaliselt välja lahjendada, kuid patogeen jääb alles. Seetõttu soovitatatakse laiali külvata igast proovist 100 µl, 1/100 kuni 1/10 000 lahjendused MTNA-söötmel või NCP-88-söötmel (5. liide) (kui kasutatakse 90 mm diameetriga Petri tasse; muude tassisuuruste puhul kohandatakse kogust), kasutades spaatlit (hokikepikujulist) ja söotmeplaadile laialikülvamise meetodit.

Märkus:

Alternatiivseks võimaluseks on laiali külvata 100 µl esialgset kartuli bakterisademe alikvooti esimesele agariplaadile spaatliga ning seejärel viia spaatel teisele agariplaadile, tõmmates sellele spaatlile jäänud jäägid; lõpuks korratakse seda kolmandal plaadil ning lahjenduse laialikülvamine saavutatakse spaatliga.

8.1.3. Tasse inkubeeritakse pimedas temperatuuril 21–23 °C.

8.1.4. Tasside esmane uuring, võrreldes kontrolltassidega, tehakse kolme päeva möödumisel ja loetakse üle kõik bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* sarnased kolooniad, seejärel loetakse kolooniad viie, seitsme ja lõpuks kümne päeva möödumisel.

8.2. Kahtlaste kolooniate puhastamine

Märkus:

Bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* sarnased kolooniad tuleks ümber külvata YGM-söötmel baklažaanide inokuleerimiseks ja/või järgneva kindlaksmääramiseks; külvata tuleks enne seda, kui tassid kasvavad liiga täis, s.o eelistatavalt 3–5 päeva möödumisel.

8.2.1. Bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* sarnased kolooniad kantakse ühele järgnevaist söotmeist (valemid on esitatud 5. liites):

glükoostoiteagar (üksnes subkultuuri jaoks),

pärmiekstraktiga glükosopeptonagar,

pärmiekstrakti ja mineraalsooladega agar.

Inkubeeritakse 21–24 °C juures kuni kümme päeva.

C. m. subsp. sepedonicus kasvab aeglaselt, tekitades tavaliselt kümne päeva jooksul nõõpnõelapeasuuruseid kreemjaid kuplikujulisi kolooniaid. Bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* tüüpiliste kolooniate fotosid vt veebileheküljelt <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

8.2.2. Puhtuse saavutamiseks kanda uuesti.

Kasvumäärad paranevad subkultuuriga. Tüüpilised kolooniad on kreemjad või elevandiluuvärviga, mõnikord kollased, ümmargused, siledad, kõrgemad, kumera kupli kujuga, limased-vedelad, tervete servadega ning tavaliselt läbimõõduga 1–3 mm.

Lihtne värvimine Grami meetodil (9. liide) võib aidata pesade valimisel edasiste analüüside tegemiseks.

8.2.3. Määratakse kindlaks eeldatavad kultuurid (vt punkti 9) ja tehakse patogeensusanalüüs (vt punkti 10).

9. IDENTIFITSEERIMINE

Bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* eeldatavad puhaskultuurid määratakse kindlaks, kasutades vähemalt kahte järgmist analüüsist, mis põhinevad erinevatel bioloogilistel põhimõtetel.

Igasse tehtavasse analüüsi kaasatakse tuntud referentttüved, kui see on asjakohane.

9.1. Toitumuslikud ja ensümaatilised identifitseerimisanalüüsid

Määratakse järgmised fenotüübilised omadused, mis esinevad või puuduvad bakteril *C. m. subsp. sepedonicus*, kasutades järgmistes allikates kirjeldatud meetodeid: Lelliott ja Stead (1987), Klement *et al.* (1990), Schaad (2001), anonüümne (1987).

Kõiki söötmeid tuleks inkubeerida 21 °C juures ja kontrollida kuue päeva pärast. Kui kasvu ei ole, inkubeeritakse kuni 20 päeva.

Kõigis analüüsides peab olema tuntud bakteri *C. sepedonicum* kontroll. Toite- ja füsioloogilised analüüsid tuleb teha, kasutades agarsöötme subkultuuride inokulaate. Glükooasteagari kultuuridelt tuleb teha morfoloogilisi võrdlusi.

Analüüs	Oodatav tulemus
Oksüdatsiooni/fermentatsiooni katse	Inertne või nõrgalt oksüdatiivne
Oksüdaasi aktiivsus	–
Kasv 37 °C juures	–
Ureaasi aktiivsus	–
Eskuliini hüdroolüüs	+
Tärglase hüdroolüüs	puudub või nõrk
7 % NaCl taluvus	–
Indooli tekkimine	–
Katalaasi aktiivsus	+
H ₂ S tekkimine	–
Tsitraadi kasutamine	–
Želatiini vedeldamine	–
Happe glütserool	–
Happe moodustumine laktoosist	puudub või nõrk
Happe moodustumine ramnoosist	–
Happe moodustumine salitsiinist	–
Värvimine Grami järgi (9. liide)	+

9.2. IF-analüüs

- a) Valmistatakse suspensioon, milles on umbes 10^6 rakku milliliitris IF-puhvris (3. liide).
- b) Valmistatakse kohase antiseerumi kahekordsete lahjenduste rida.
- c) Tehakse IF-analüüs (punkt 4).
- d) IF-analüüsi tulemus on positiivne siis, kui kultuuri IF-tiiter võrdub positiivse kontrolli tiitriga.

9.3. PCR-analüüs

- a) Valmistatakse suspensioon, milles on umbes 10^6 rakku milliliitris ultrapuhastas vees.
- b) 100 µl suletud katseklaasides olevat rakususpensiooni kuumutatakse kuumutusplakil või keevas veevannis 100 °C juures 4 minutit. Vajaduse korral võib äsja valmistatud NaOH lisamine 0,05 M lõppkontsentratsioonile aidata kaasa rakulüüsile. Seejärel võib proove säilitada – 16 kuni – 24 °C juures, kuni neid on tarvis.
- c) Bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* spetsiifiliste amplikonide amplifitseerimiseks tehakse kohane PCR-analüüs (näiteks Pastrik, 2000; vt 4. liidet; Li ja de Boer, 1995; Mills *et al.*, 1997; Pastrik ja Rainey, 1999; Schaad *et al.*, 1999).
- d) Bakterit *C. m. subsp. sepedonicus* saab positiivselt kindlaks määrata siis, kui PCR-amplikonidel on positiivse kontrolli tüvega sama suurus ja neil esineb sama pikkusega restriksioonifragmentide polümorfism.

9.4. FISH-analüüs

- a) Valmistatakse suspensioon, milles on umbes 10^6 rakku milliliitris ultrapuhastas vees.
- b) Tehakse FISH-analüüs (punkt 5).
- c) FISH-analüüsi tulemus on positiivne siis, kui kultuur ja positiivne kontroll annavad samad reaktsioonid.

9.5. Rasvhapete profileerimine (Fatty acid profiling – FAP)

- a) Kultuuri kasvatatakse trüptikaas-sojaagaril (Oxoid) 72 tundi temperatuuril 21 °C (+/– 1°).
- b) Tehakse kohane FAP-analüüs (Janse, 1991; Stead, 1992).
- c) FAP-analüüsi tulemus on positiivne siis, kui eeldatava kultuuri profiil on identne positiivse kontrolli profiiliga. Tüüpiline rasvhapete esinemine on järgmine: 15:1 Anteiso A, 15:0 Iso, 15:0 Anteiso, 16:0 Iso, 16:0 ja 17:0 Anteiso. Selline profiil osutab suure tõenäosusega bakterile *C. m. sepedonicus*. Muudel perekondadel, nagu *Curtobacterium*, *Arthrobacter* ja *Micrococcus*, esineb ka selliseid happeid, kuid 15:1 Anteiso A on neis bakterites harva esinev hape, mida on kõigis bakterites *Clavibacter* spp. umbes 1–5 %. Bakteris *C. m. sepedonicus* on seda tavaliselt umbes 5 %.

9.6. BOX-PCR-analüüs

- a) Valmistatakse suspensioon, milles on umbes 10^6 rakku milliliitris ultrapuhastas vees.
- b) Tehakse analüüs vastavalt menetlusele (Smith *et al.*, 2001).

10. KINNITUSANALÜÜS

Bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* diagnoosi lõplikuks kinnitamiseks ja bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* kindlaksmääratud kultuuride virulentsuse hindamiseks tuleb teha patogeensusanalüüs.

- 10.1. Analüüsitava isolaadi kolme päeva vanusest isolaadist ja bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* kohasest positiivse kontrolli tüvest tehakse inokulaat, milles on umbes 10^6 rakku milliliitris.

- 10.2. Inokuleeritakse 5–10 kolmandas leheetapis noore baklažaaniseemiku vart (punkt 7.3 või 7.4).
- 10.3. Inkubeeritakse temperatuuril 18–24 °C piisava valguse ja suure suhtelise niiskuse juures ning kastetakse parajal määral, et vältida ülekastmist ja kuivamist (punkt 7.7). Puhaste kultuuridega peaks tüüpiline närbumine toimuma kahe nädala jooksul, kuid taimi, millel ei ole selle aja järel sümptomeid (vt punkti 7.8), tuleks seejärel inkubeerida kuni kolm nädalat temperatuuril, mis soosib baklažaanide kasvu, kuid ei ole üle 25 °C (8. liide). Kui kolme nädala pärast ei ole sümptomeid, ei saa kultuuri pidada bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* patogeenseks vormiks.
- 10.4. Isoleeritakse sümptomitega taimedest, eraldades varreosa 2 cm kõrguselt inokulatsioonipunktist. Purustatakse ja lahustatakse väheses koguses steriilses destilleeritud vees või 50 mM fosfaatpuhvis (3. liide). Isoleeritakse suspensioonist, hõõrudes spaatliga laiali või tehes joonkülv MTNA- ja YPGA-söötmel (5. liide), inkubeeritakse 3–5 päeva temperatuuril 21–23 °C ja vaadeldakse bakterile *C. m. subsp. sepedonicus* tüüpiliste pesade tekkimist.

1. liide

Protokollide optimeerimise ja valideerimisega tegelevad laborid

Labor ⁽¹⁾	Asukoht	Riik
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Viin ja Linz	Austria
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Belgia
Plantedirektoratet	Lyngby	Taani
Central Science Laboratory	York	Inglismaa
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburgh	Šotimaa
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	France
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	France
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Saksamaa
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Saksamaa
State Laboratory	Dublin	Iirimaa
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Holland
Norwegian Crop Research Institute, Plant Protection Centre	Aas	Norra
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lissabon	Portugal
Nacionalni institut za biologijo	Ljubljana	Sloveenia
Centro de Diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	Hispaania

⁽¹⁾ Kontaktteadurid – vt veebilehekülge <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

2. liide

Positiivsete ja negatiivsete kontrollide valmistamine südamike PCR/IF ja FISH-sõelkatsete jaoks

Tehakse bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* virulentse tüve [NCPB 4053 või PD 406] 72-tunnine kultuur MTNA-põhisõotmel ja suspendeeritakse 10 mM fosfaatpuhvrts, et saada rakkude tiheduseks umbes $1-2 \times 10^8$ kolooniaid moodustavat osakest milliliitris. See saadakse tavaliselt veidi häguses suspensioonis, mis mõõtmisel 600 nanomeetri juures vastab optilisele tihedusele 0,20.

Eemaldatakse basaalsed tipusüdamikud 200 mugulalt, mis on pärit valgekoorelise sordi saagist, mille kohta on teada, et selles ei ole bakterit *C. m. subsp. sepedonicus*.

Basaalseid tipusüdamikke töödeldakse tavaliselt ja bakterisade resuspendeeritakse 10 milliliitris.

Valmistatakse kümme steriilset 1,5 ml mikroampulli 900 µl resuspendeeritud bakterisademega.

100 µl bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* suspensiooni pannakse esimesse mikroampulli. Loksutatakse vorteksil.

Saastetase määratakse lahjenduste kümnendreaga järgmises viies mikroampullis.

Kuut saastunud mikroampulli kasutatakse positiivsete kontrollidena. Nelja saastumata mikroampulli kasutatakse negatiivsete kontrollidena. Mikroampullid märgistatakse vastavalt.

Steriilsetes 1,5 ml mikroampullides valmistatakse 100 µl alikvoodid ning saadakse seega iga kontrollproovi üheksa koopt. Säilitatakse – 16 kuni – 24 °C juures kuni kasutamiseni.

Bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* olemasolu ja kvantifikatsioon kontrollproovides tuleks esmalt kinnitada IF-analüüsiga.

PCR-analüüsiks ekstraheeritakse DNA positiivsetest ja negatiivsetest kontrollproovidest iga analüüsitava proovide seeria puhul.

IF- ja FISH-analüüsiks analüüsitakse positiivseid ja negatiivseid kontrollproove iga analüüsitava proovide seeria puhul.

IF-, FISH- ja PCR-analüüsides tuleb avastada bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* vähemalt 10^6 ja 10^4 rakku milliliitris positiivsetes kontrollides ning bakterit ei tohi olla üheski negatiivses kontrollis.

3. liide

Analüüsimenetluste puhvrid

ÜLDNÕUE: Avamata steriilseid puhvreid võib säilitada kuni ühe aasta.

1. Ekstraktsioonimenetluste puhvrid**1.1. Ekstraktsioonipuhver (50 mM fosfaatpuhver, pH 7,0)**

Seda puhvrit kasutatakse bakteri eraldamiseks taimekudedest homogeneenimise või loksutamise teel.

Na ₂ HPO ₄ (veevaba)	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
Destilleeritud vesi	1,00 l

Ained lahustatakse, kontrollitakse pH ja steriliseeritakse autoklaavis 121 °C juures 15 minutit.

Võib lisada muid aineid järgmiselt:

	Eesmärk	Kogus (liitri kohta)
Lubrol-helbed	Deflokulant (*)	0,5 g
DC-silikooniga vahutamisvastane aine	Vahutamisvastane aine (*)	1,0 ml
Tetranaatriumpürofosfaat	Antioksidant	1,0 g
Polüvinüülpirrolidoon-40 000 (PVP-40)	PCR-inhibiitorite siduja	50 g

(*) Kasutamiseks ekstraktsioonimenetluses homogeneenimise teel.

1.2. Kontsentreeritud bakterisademe puhver (10 mM fosfaatpuhver, pH 7,2)

Seda puhvrit kasutatakse kartulimugula basaalse tipusüdamiku ekstraktide resuspendeerimiseks pärast kontsentreerimist bakterisademeks tsentrifugimise teel.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,4 g
Destilleeritud vesi	1,00 l

Ained lahustatakse, kontrollitakse pH ja steriliseeritakse autoklaavis 121 °C juures 15 minutit.

2. IF-analüüsi puhvrid**2.1. IF-puhver (10 mM fosfaatpuhvri lisandiga keedusoolalahus (PBS), pH 7,2)**

Seda puhvrit kasutatakse antikehade lahjendamiseks.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,4 g
NaCl	8,0 g
Destilleeritud vesi	1,00 l

Ained lahustatakse, kontrollitakse pH ja steriliseeritakse autoklaavis 121 °C juures 15 minutit.

2.2. IF-puhver Tweeniga

Seda puhvrit kasutatakse objektiklaaside pesemiseks.

IF-puhvrile lisatakse 0,1 % Tween 20.

2.3. Fosfaatpuhvri lisandiga glütserool, pH 7,6

Seda puhvrit kasutatakse kattevedelikuna fluorestseerumise suurendamiseks IF-objektiklaaside aknaväljades.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	3,2 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,15 g
Glütserool	50 ml
Destilleeritud vesi	100 ml

Fluorestseerumise tuhmumise vastased kattevedelikud on müügil, näiteks Vectashield® (Vector Laboratories) või Citifluor® (Leica).

4. liide

Bakterite koguse määramine IF-ja FISH-analüüsides

1. Loendatakse keskmine tüüpiliste fluorestseeruvate rakkude arv välja kohta (c).
2. Arvutatakse tüüpiliste fluorestseeruvate rakkude arv objektiklaasi akna kohta (C).

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

Kus S = mitmekohalise objektiklaasi aknavälja pindala ja
s = objektiivi pindala

$s = \pi^2/4G^2K^2$ kus i = välja koefitsient (sõltub okulaari tüübist ja on 8–24)
K = toru koefitsient (1 või 1,25)
G = objektiivi suurendus (100x, 40x jne)

3. Arvutatakse tüüpiliste fluorestseeruvate rakkude arv milliliitri resuspendeeritud bakterisademe kohta (N).

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

kus y = resuspendeeritud bakterisademe maht igas aknas ja
F = resuspendeeritud bakterisademe lahjendustegur

5. liide

Bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* isoleerimis- ja kasvusöötmed

a) Üldised kasvusöötmed

Toiteagar

Toiteagar (Difco)	23,0 g
Destilleeritud vesi	1,0 l

Ained lahustatakse ja steriliseeritakse autoklaavis 121 °C juures 15 minutit.

Glükoostoiteagar

Difco Bacto agarsööde, mis sisaldab 1 % D(+)-glükoosi (monohüdraat). Steriliseeritakse autoklaavis 115 °C juures 20 minutit.

Pärmiekstraktiga glükoospeptonagar

Pärmiekstrakt (Difco)	5,0 g
Bacto-pepton (Difco)	5,0 g
D(+)-glükoos (monohüdraat)	10,0 g
Bacto-agar (Difco)	15,0 g
Destilleeritud vesi	1,0 l

Ained lahustatakse ja steriliseeritakse autoklaavis 121 °C juures 15 minutit.

Pärmiekstrakti ja mineraaloolade kasvuagar

Bacto-pärmiekstrakt (Difco)	2,0 g
D(+)-glükoos (monohüdraat)	2,5
K ₂ HPO ₄	0,25 g
KH ₂ PO ₄	0,25 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,015 g
NaCl	0,05 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,005 g
Bacto-agar (Difco)	18 g
Destilleeritud vesi	1,00 l

Ained lahustatakse ja 0,5-liitrised söötmekogused steriliseeritakse autoklaavis 115 °C juures 20 minutit.

b) Valideeritud selektiivsed kasvusöötmed

MTNA-sööde

Kõik söötmekomponendid on BDHst, kui ei ole märgitud teisiti.

Pärmiekstrakt (Difco)	2,0 g
Mannitool	2,5 g
K ₂ HPO ₄	0,25 g

KH_2PO_4	0,25 g
NaCl	0,05 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,015 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,005 g
Agar (Oxoid nr 1)	16,0 g
Destilleeritud vesi	1,0 l

Ained lahustatakse, pH reguleeritakse 7,2-le. Pärast autoklaavimist (121 °C juures 15 minutit) ja mahajahutamist 50 °C lisatakse antibiootikumid: trimetoprimi 0,06 g, nalidiksiinhapet 0,002 g, amfoteritsiin B 0,01 g.

Antibiootilised alglahused: trimetoprim (Sigma) ja nalidiksiinhape (Sigma) (mõlemat 5 mg/ml) 96 % metanoolis, amfoteritsiin B (Sigma) dimetüülsulfoksiidis. Alglahused on filter-steriliseeritud.

Märkus:

Põhisöötme säilivus on kolm kuud. Pärast antibiootikumide lisamist on säilivus üks kuu, kui säilitatakse külmas.

NCP-88-sööde

Toiteagar (Difco)	23 g
Pärmiekstrakt (Difco)	2 g
D-mannitool	5 g
K_2HPO_4	2 g
KH_2PO_4	0,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25 g
Destilleeritud vesi	1,00 l

Ained lahustatakse, pH reguleeritakse 7,2-le. Pärast autoklaavimist ja mahajahutamist 50 °C lisatakse järgmised antibiootikumid: polümüksiin B sulfaati (Sigma) 0,003 g, nalidiksiinhapet (Sigma) 0,008 g, tsükloheksimiidi (Sigma) 0,2 g.

Antibiootikumid lahustatakse alglahustes järgmiselt: nalidiksiinhape 0,01 M NaOH, tsükloheksimiid 50 % etanoolis, polümüksiin B sulfaat destilleeritud vees. Alglahused on filter-steriliseeritud.

Märkus:

Põhisöötme säilivus on kolm kuud. Pärast antibiootikumide lisamist on säilivus üks kuu, kui säilitatakse külmas.

—

6. liide

Valideeritud PCR-protokoll ja -reaktiivid

Märkus:

Eelanalüüsid peaksid võimaldama reprodutseeritavalt avastada vähemalt 10^3 kuni 10^4 bakteri *C. m. sepe donicus* rakku prooviekstrakti milliliitris.

Eelanalüüsid ei tohiks anda valepositiivseid tulemusi valitud bakteritüvedega.

1. Mitmeetapiline PCR-protokoll sisemise PCR-kontrolliga (Pastrik, 2000)

1.1. Oligonukleotiidpraimerid

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

Bakteri *C. m. subsp. sepe donicus* maatriks-DNA eeldatav amplikonipikkus on 502 aluspaari (PSA-praimerite kompleks)

18S rRNA sisemise PCR-kontrolli eeldatav amplikonipikkus on 377 aluspaari (NS-praimerite kompleks)

1.2. PCR-reaktsioonisegu

Reaktiiv	Kogus reaktsiooni kohta	Lõppkontsentratsioon
Steriilne ultrapuhas vesi	15,725 µl	
10x PCR-puhver ⁽¹⁾ (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1x (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (fraktsioon V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
d-nTP-segu (20mM)	0,125 µl	0,1 mM
Praimer PSA-1 (10µM)	0,5 µl	0,2 µM
Praimer PSA-R (10µM)	0,5 µl	0,2 µM
Praimer NS-7-F (10µM) ⁽²⁾	0,1 µl	0,04 µM
Praimer NS-8-R (10µM) ⁽²⁾	0,1 µl	0,04 µM
Taq-polümeraas (5U/µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1,0 U
Proovi maht	5,0 µl	
Kogumaht:	25,0 µl	

⁽¹⁾ Meetodid valideeriti, kasutades Perkin Elmeri (AmpliTaQ või Gold) ja Gibco BRL Taq-polümeraasi.

⁽²⁾ Kartuli basaalse tipusüdame ekstrakti puhul optimeeriti praimerite NS-7 F ja NS-8-R kontsentratsioonid, kasutades homogeennimismetodeid ja DNA puhastamist vastavalt Pastrikule (2000) (vt punkti 6.1 lõiget a ja punkti 6.2). Kui kasutatakse loksutamise teel DNA ekstraheerimist või muid isoleerimismetodeid, on vaja reaktiivikontsentratsioonid uuesti optimeerida.

1.3. PCR-reaktsiooni tingimused

Järgitakse järgmist menetlust:

1 tsüklil:	i)	3 minutit 95 °C juures (maatriks-DNA denaturatsioon)
10 tsükli:	ii)	1 minut 95 °C juures (maatriks-DNA denaturatsioon)
	iii)	1 minut 64 °C juures (praimerite anniilimine)
	iv)	1 minut 72 °C juures (koopia ekstensioon)

25 tsükli:	v)	30 sekundit 95 °C juures (maatriks-DNA denaturatsioon)
	vi)	30 sekundit 62 °C juures (praimerite anniilimine)
	vii)	1 minut 72 °C juures (koopia ekstensioon)
1 tsükkel:	viii)	5 minutit 72 °C juures (lõplik ekstensioon)
	ix)	hoitakse 4 °C juures

Märkus:

Programm on optimeeritud kasutamiseks MJ Research PTC 200 termotsükleriga. Muude mudelite kasutamisel võib olla vaja muuta tsükliite ii, iii, iv, v, vi ja vii kestust.

1.4. Amplikoni restriksioonensüümi analüüs

Bakteri *C. m. subsp. sepedonicus* DNast amplifitseeritud PCR-produktid võivad ensüümiga Bgl II anda tüüpilise pikkusega restriksioonifragmentide polümorfismi, kui neid on inkubeeritud 37 °C juures 30 minutit. Bakterile *C. m. subsp. sepedonicus* tüüpilisest fragmendist saadud restriksioonifragmentide pikkus on 282 ja 220 aluspaari.

2. Täitepuhvri valmistamine

2.1. Bromofenoolsinine (10 % põhilahus)

Bromofenoolsinine	5 g
Kaks korda destilleeritud vesi	50 ml

2.2. Täitepuhver

Glütserool (86 %)	3,5 ml
Bromofenoolsinine (5,1)	300 µl
Kaks korda destilleeritud vesi	6,2 ml

3. 10x Trisatsetaat EDTA puhver, pH 8,0

Tris-puhver	48,4 g
Jää-äädikas	11,42 ml
EDTA (dinaatriumsool)	3,72 g
Destilleeritud vesi	1,00 l

Enne kasutamist lahjendatakse 1x.

On ka müügil (näiteks Invitrogen või samaväärne).

7. liide

FISH-analüüsi valideeritud reaktiivid**1. Oligoproovid**

Cms-spetsiifiline oligoproov CMS-CY3-01: 5'- ttg cgg ggc gca cat ctc tgc acg -3'

Mittespetsiifiline eubakteriaalne oligoproov EUB-338-FITC: 5'- gct gcc tcc cgt agg agt-3'

2. Kinnitilahus

[HOIATUS! KINNITI SISALDAB PARAFORMALDEHÜÜDI, MIS ON MÜRGINE. TULEB KANDA KINDAID JA SEDA EI TOHI SISSE HINGATA. ON SOOVITATAV TÖÖTADA TÕMBEKAPIS.]

- i) 9 ml molekulaarbioloogias kasutatavat vett (näiteks ultrapuhas vett) kuumutatakse umbes 60 °C ja lisatakse 0,4 g paraformaldehüüdi. Paraformaldehüüd lahustub pärast seda, kui on lisatud 5 tilka 1N NaOH ja segatud magnetsegajaga.
- ii) pH reguleeritakse 7,0-le, lisades 1 ml 0,1 M fosfaatpuhvrit (pH 7,0) ja 5 tilka 1N HCl. pH-d kontrollitakse indikaatorribadega ja vajaduse korral reguleeritakse HCl või NaOH-ga.

[HOIATUS! PARAFORMALDEHÜÜDI LAHUSTE PUHUL EI TOHI KASUTADA PH-MEETRIT.]

- iii) Lahus filtreeritakse läbi 0,22 µm membraanfiltrit ja säilitatakse edasiseks kasutamiseks tolmuvabalt 4 °C juures.
- iv) Märkus:
Alternatiivne kinnistilahus: 96 % etanool.

3. 3x Hybmix-lahus

NaCl 2,7 M

Tris-HCl 60 mM (pH 7,4)

EDTA (filter-steriliseeritud ja autoklaavitud) 15 mM

Lahjendatakse 1x vastavalt vajadusele.

4. Hübridisatsioonilahus

1x Hybmix-lahus

Naatriumdodetsüülsulfaat 0,01 %

oligoproov EUB 338 5 ng/µl

oligoproov CMSCY301 5 ng/µl

Hübridisatsioonilahused valmistatakse vastavalt tabelis 1 arvatud kogustele. Iga objektiklaasi jaoks (millel on kaks erinevat proovi kaks korda) on tarvis 90 µl hübridisatsioonilahust.

Tabel. Hübridisatsioonisegu valmistamiseks soovitatavad kogused

Objektiklaaside kogus:	2	8
Steriilne ultrapuhas vesi	50,1	200,4
3x Hybmix-lahus	30,0	120,0
1 % SDS	0,9	3,6
Oligoproov EUB 338 (100 ng/µl)	4,5	18,0
Oligoproov CMSCY301 (100 ng/µl)	4,5	18,0
Kogumaht (µl)	90,0	360,0

NB. Kõiki valgustundlikke oligoproove sisaldavaid lahuseid säilitatakse pimedas – 20 °C juures. Kasutamise ajal välditakse otsest päikese- või elektrivalgust.

5. 0,1M fosfaatpuhver, pH 7,0

Na ₂ HPO ₄	8,52 g
KH ₂ PO ₄	5,44 g
Destilleeritud vesi	1,00 l

Ained lahustatakse, kontrollitakse pH ja steriliseeritakse autoklaavis 121 °C juures 15 minutit.

8. liide**Baklažaani kultuuri kasvatamistingimused**

Baklažaani (*Solanum melongena*) seemned külvatakse pastöriseeritud külvikomposti. Täielikult avanenud idulehtedega (10–14 päeva) seemikud istutatakse ümber pastöriseeritud istutuskomposti.

Baklažaanid peaksid olema kasvatatud kasvuhoones järgmistel keskkonnatingimustel:

Päeva pikkus:	14 tundi või looduslik päevapikkus, kui see on pikem;
Temperatuur:	päeval: 21–24 °C,
	öösel: 15 °C.

Haigusele vastuvõtlikud baklažaanisordid:	“Black Beauty”,
	“Long Tom”,
	“Rima”,
	“Balsas”.

Tarnija: vt veebilehekülge <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

9. liide

Grami järgi värvimine (Huckeri muudatus) (Doetsch, 1981) ⁽¹⁾*Kristallvioleti lahus*

2 g kristallvioletti lahustatakse 20 ml 95 % etanoolis.

0,8 g ammooniumoksalaati lahustatakse 80 ml destilleeritud vees.

Kaks lahust segatakse.

Lugoli jood

Jood	1 g
Kaaliumjodiid	2 g
Destilleeritud vesi	300 ml

Ained purustatakse koos uhmriskuhmris. Lisatakse vette ja segatakse suletud nõus kuni lahustumiseni.

Safraniini kontrastvärvilahus

Põhilahus:

Safraniin O	2,5 g
95 % etanool	100 ml

Segatakse ja jäetakse seisma.

Lahjendatakse 1:10 töölahuse saamiseks.

Värvimine

1. Valmistatakse äged, kuivatatakse õhu käes ja kinnitatakse kuumutades.
2. Objektklaasi ujutatakse kristallvioleti lahuses üks minut.
3. Pestakse kiiresti kraanivee all.
4. Ujutatakse Lugoli joodis üks minut.
5. Pestakse kraaniveega ja kuivatatakse kuivatuspaberiga.
6. Värvitustatakse 95 % etanooliga, mis lisatakse tilkhaaval, kuni kogu värv on eemaldunud, või leotatakse veidi loksutades 30 sekundit.
7. Pestakse kraaniveega ja kuivatatakse kuivatuspaberiga.
8. Ujutatakse safraniinilahuses 10 sekundit.
9. Pestakse kraaniveega ja kuivatatakse kuivatuspaberiga.

Grampositiivsed bakterid värvuvad lillakassinisteks; gramnegatiivsed bakterid värvuvad roosakaspunaseks.

⁽¹⁾ Võib kasutada ka müügil olevaid lahuseid ja värvaineid.

VIITED

1. Anonüümne, 1987. Scheme of the detection and diagnosis of the ring rot bacterium *Corynebacterium sepedonicum* in batches of potato tubers. Euroopa Ühenduste Komisjon, Luxembourg. Publ EUR 11 288 EN, 21 lk.
2. Bradbury, J. F., 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. Rev. Pl. Path., 49, 213–218.
3. Dinesen, I. G., 1984. The extraction and diagnosis of *Corynebacterium sepedonicum* from diseased potato tubers. EPPO Bull. 14 (2), 147–152.
4. Doetsch, R. N., 1981. Determinative methods of light microscopy. In: Manual of methods for general bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, 21–23.
5. Hugh, R. ja Leifson, F., 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. J. Bact., 66, 24–26.
6. Janse, J. D., 1991. Infra- and intra-specific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty-acid analysis. Systematic and Applied Microbiology 14; 335–345.
7. Janse, J. D. ja J. Van Vaerenbergh. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (*Corynebacterium sepedonicum*) in potato. EPPO Bull., nr 17, 1987, lk 1–10.
8. Jansing, H. ja K. Rudolph, 1998. Physiological capabilities of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* and development of a semi-selective medium. Journal of Plant Diseases and Protection, 105, 590–601.
9. Kovacs, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature, Lond., 178, 703.
10. Klement Z.; Rudolph, K and D. C. Sands, 1990. Methods in Phytobacteriology. Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 lk.
11. Lelliott, R. A., 1966. The plant pathogenic coryneform bacteria. J. appl. Bact., 29, 114–118.
12. Lelliott, R. A., E. Billing ja A. C. Hayward, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads J. appl. Bact., 29, 470–489.
13. Lelliott, R. A. ja P. W., Sellar, 1976. The detection of latent ring rot (*Corynebacterium sepedonicum* (Spiek. et Koth.) Skapt. et Burkh.) in potato stocks. EPPO Bull., 6 (2), 101–106.
14. Li, X. ja S.H. de Boer, 1995. Selection of Polymerase Chain Reaction primers from RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Phytopathology, 85, 837–842.
15. Mills, D., Russell, B., W. ja J., W. Hanus, 1997. Specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* by amplification of three unique DNA sequences isolated by subtraction hybridization. Phytopathology, 87, 8, 853–861.
16. Pastrik, K. -H. ja R. A. Rainey. 1999. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. J. Phytopathology 147; 687–693.
17. Pastrik, K.-H., 2000. Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. European Journal of Plant Pathology, 106, 155–165.
18. Ramamurthi, C. S., 1959. Comparative studies on some Gram-positive phytopathogenic bacteria and their relationship to the Corynebacteria. Mem. Cornell agric. Exp. Sta., 366, 52 lk.
19. Schaad, W., Berthier-Schaad, Y., Sechler, A. ja Knorr, D. (1999) Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system. Plant Disease 83; 1095–1100.
20. Schaad, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Schaad [Hrsg.]. - 3. ed.; St. Paul, Minnesota; 373 lk.
21. Skerman, V. B. D., 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria. 2nd ed., William and Wilkins Company, Baltimore.
22. Smith, N. C.; Hennesy, J; Stead, D.E., 2001. Repetitive sequence-derived PCR profiling using the BOX-A1/*Ralstonia solanacearum* primer for rapid identification of plant pathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. European Journal of Plant Pathology, 107 (7), 739–748.
23. Sneath, P. H. A. ja V. G. Collins, 1974. A study in test reproducibility between laboratories: report of *Pseudomonas* working party. Antonie van Leeuwenhoek, 40, 481–527.
24. Stead, D.E. 1992. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty-acid profiles. International Journal of Systematic Bacteriology 42; 281–295.
25. Wullings, B. A.; van Beuningen, A. R.; Janse, J. D. ja A. D. L. Akkermans, 1998. Detection of *Ralstonia solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent *in situ* hybridization with 23s rRNA-targeted probes. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4546–4554.

II LISA

1. Iga haigusetekiataja esinemise kahtluse korral, mille kohta on saadud vastavalt I lisas esitatud meetoditele läbi viidud sõelkatse(te)s positiivne tulemus ning oodatakse kõnealuste meetodite abil kinnitust või ümberlükkamist, tuleks alles hoida ja nõuetekohaselt säilitada

- kõik mugulad, millest proov on võetud, ning võimaluse korral kõik taimed, millelt proov on võetud,
- kõik järelejäänud ekstraktid ja sõelkatse(te)ks valmistatud lisamaterjalid, nt immunofluorestsents-objektiklaasid,
ja
- kõik asjakohased dokumendid

kuni kõnealuste meetodi(te) lõpuleviimiseni.

Mugulate säilitamine võimaldab teha sordikatseid, kui see on asjakohane.

2. Organismi olemasolu kinnituse puhul tuleks alles hoida ja nõuetekohaselt säilitada

- lõikes 1 määratletud materjal,
ja
- mugula- või taimeekstraktiga nakatatud baklažaani proov
ning
- organismi isoleeritud kultuur

vähemalt ühe kuu jooksul pärast teatamist vastavalt artikli 5 lõikele 2.

III LISA

1. Tõenäolise saastumise ulatuse määramisel vastavalt artikli 5 lõike 1 punktile b tuleb kontrollida järgmisi objekte:
 - tootmiskohas kasvatatud mugulad või taimed, mis on tunnistatud saastunuks vastavalt artikli 5 lõike 1 punktile a,
 - tootmiskoht või -kohad, kus mingil tootmisetapil on olnud mugulad või taimed, mis on tunnistatud saastunuks vastavalt artikli 5 lõike 1 punktile a, sealhulgas need, kus tootmisseadmeid või -vahendeid jagatakse omavahel otseselt või ühise lepingulise tööttevõtja kaudu,
 - mugulad või taimed, mida kasvatati eelmises taandes osutatud tootmiskohas või -kohtades või hoiti sellises tootmiskohas või -kohtades ajavahemikul, kui vastavalt artikli 5 lõike 1 punktile a saastunuks tunnistatud mugulad või taimed olid esimeses taandes osutatud kohas,
 - ettevõtted, mis käitlevad eelmistes taanetes nimetatud tootmiskohtadest pärit kartuleid,
 - mis tahes seadmed, veokid, anumad, laod või nende osad ning mis tahes muud objektid, sealhulgas pakkematerjal, mis on võinud olla kontaktis mugulate või taimedega, mis on tunnistatud saastunuks artikli 5 lõike 1 punkti a alusel,
 - kõik mugulad või taimed, mida on hoitud eelmises taandes loetletud ehitiste või objektide sees või nendega kokkupuutes enne nende ehitiste ja objektide puhastamist ja desinfitseerimist,
 - artikli 6 alusel tehtud laboratoorsete analüüside tulemusel artikli 5 lõike 1 punkti a alusel saastunuks tunnistatud mugulate või taimedega samast kloonist pärinevad kartulimugulad või -taimed, mille saastumine võib olla tõenäoline taime kloonide kaudu, kuigi analüüsi tulemused organismi osas on võinud olla negatiivsed. Saastunud ja kloni kaudu seotud mugulate või taimede suguluse tõendamiseks võib teha sordikatseid,
 - eelmises taandes osutatud mugulate või taimede tootmiskoht või -kohad.
2. Võimaliku leviku määramisel vastavalt artikli 5 lõike 1 punktile c tuleb arvesse võtta järgmisi asjaolusid:
 - muude kartuli või muude peremeestaimede tootmiskohtade lähedust,
 - seemnekartulivarude ühist tootmist ja kasutamist.
3. Artikli 5 lõike 2 esimeses lõigus osutatud teatis esitatakse järgmiselt:
 - kohe pärast organismi olemasolu kinnitamist laborianalüüsidega, kasutades I lisas sätestatud meetodeid, esitades vähemalt:
 - kartulipartii sordi nimi,
 - kartuli kasutusotstarve (tarbekartul, seemnekartul jne) ja seemnekartuli kategooria, kui see on kohaldatav,
 - kui on kartuli saasteoht teisest liikmesriigist (teistest liikmesriikidest) või teise liikmesriiki (teistesse liikmesriikidesse), esitab liikmesriik, kus saastumise esinemine on kinnitust leidnud, viivitamata vajaliku teabe, mis võimaldab asjaomasel liikmesriigil (asjaomastel liikmesriikidel) täita artikli 5 lõike 3 nõudeid, näiteks:
 - kartulipartii sordi nimi,
 - kaubasaatja ja kaubasaaja nimi ja aadress,
 - kartulipartii tarnekuupäev,

- tarnitud kartulipartii suurus,
- taimepassi koopia või vähemalt taimepassi number, kui see on asjakohane, ning kartulikasvataja või turustaja registreerimisnumber, kui see on asjakohane, ja saatedokumendi koopia.

Kui sellist teavet esitatakse, teatatakse sellest viivitamata komisjonile.

- pärast kõigi uuringute lõppu teatatakse iga juhtumi puhul:
 - kuupäev, millal saastumine kinnitati,
 - lühikirjeldus tehtud uurimisest saasteallika kindlaksmääramise ja saastumise võimaliku leviku kohta,
 - teave kindlakstehtud või oletatava(te) saasteallika(te) kohta,
 - täpne teave saastunuks tunnistamise ulatuse kohta, sealhulgas tootmiskohtade arv ja partiide arv koos sordi nime ja seemnekartuli puhul kategooriaga,
 - üksikasjad tsooni piiritlemise kohta, sealhulgas tootmiskohtade arv, mis ei ole tunnistatud saastunuks, kuid mida tsoon hõlmab,
 - muu teave, mis on seotud kinnitatud haiguspuhangu(te)ga ja mida komisjon võib nõuda.
-

IV LISA

1. Artikli 7 lõikes 1 osutatud ametlikud järelevalvemeetmed on:

- loomasöödana kasutamine pärast niisugust kuumtöötlemist, mille järel puudub organismi ellujäämise oht,
- või
- kõrvaldamine ametlikult heakskiidetud jäätmekäitluskohas, kus ei teki organismi keskkonda pääsemise identifitseeritavat riski nt põllumajandusmaadesse imbumise kaudu,
- või
- tuhastamine,
- või
- tööstuslikuks töötlemiseks kasutamine otsese ja vahetu tarnimisega töötlevasse tehasesse, kus on ametlikult heakskiidetud jäätmete kõrvaldamise seadmed, mille puhul on kindlaks tehtud, et ei ole organismi leviku identifitseeritavat ohtu, ning vähemalt väljuvate sõidukite puhastamise ja desinfitseerimise süsteem,
- või
- muud meetmed, tingimusel et on kindlaks tehtud, et ei ole organismi leviku identifitseeritavat ohtu; sellistest meetmetest ja nende põhjendustest tuleb teatada komisjonile ja teistele liikmesriikidele.

Mis tahes muud jäätmed, mis on seotud eespool nimetatud tingimustega või mis tekivad nende tõttu, kõrvaldatakse ametlikult heaks kiidetud meetoditel vastavalt käesoleva direktiivi V lisale.

2. Artikli 5 lõike 1 punkti b alusel tõenäoliselt saastunuks tunnistatud ja artikli 7 lõikes 2 osutatud mugulate või taimede asjakohane kasutamine või kõrvaldamine vastavate liikmesriikide vastutavate ametiasutuste kontrolli all koos vastutavate ametiasutuste vahelise infovahetusega, et tagada pidev kontroll ja selle liikmesriigi vastutavate ametiasutuste heakskiit, kus kartulid pakendatakse või neid töödeldakse esimeses ja teises taandes osutatud jäätmete kõrvaldamise seadmetes, on järgmine:

- kasutamine toiduks ette nähtud tarbekartulina, mis on valmis pakendatud otsetarnimiseks ja kasutamiseks ümberpakendamata kohas, kus on asjakohased jäätmete kõrvaldamise seadmed. Seemnekartuliks ette nähtud kartuleid võib töödelda samas kohas ainult siis, kui seda tehakse eraldi või pärast puhastamist ja desinfitseerimist,
- või
- kasutamine tööstuslikuks töötlemiseks ette nähtud tarbekartulina, mis tuleb otse ja vahetult tarnida töötlemistevõttesse, kus on nõuetekohased jäätmete kõrvaldamise seadmed ja vähemalt lahkuvate sõidukite puhastamise ja desinfitseerimise süsteem,
- või
- muu kasutamine või kõrvaldamine, tingimusel et ei esine organismi leviku identifitseeritavat ohtu ning selle on heaks kiitnud kõnealused vastutavad ametiasutused.

3. Artikli 7 lõikes 3 osutatud objektide puhastamise ja desinfitseerimise asjakohased meetodid on need, mille puhul on kindlaks tehtud, et ei ole organismi leviku identifitseeritavat ohtu, ja mida kasutatakse liikmesriikide vastutavate ametiasutuste järelevalve all.

4. Liikmesriikide rakendatavad meetmed artikli 5 lõike 1 punktis c kehtestatud ja artikli 7 lõikes 4 osutatud piiritletud tsoonis on järgmised.

4.1. Artikli 5 lõike 1 punkti a alusel saastunuks tunnistatud tootmiskohtades:

- a) artikli 5 lõike 1 punkti a alusel saastunuks tunnistatud põllul, kas
- i) — vähemalt kolme kasvatusaasta jooksul pärast saastunuks tunnistamise aastat
 - võetakse meetmed iseeneslikult kasvama läinud kartulitaimede ja muude organismi looduslikult esinevate peremeestaimede kõrvaldamiseks
 - ning
 - kartulimugulaid, -taimi või -seemneid ega muid looduslikult esinevaid organismi peremeestaimi või põllukultuure, mille puhul on organismi leviku identifitseeritav oht, ei panda maha, istutata ega külvata
 - esimesel kartuli kasvuaastal, mis järgneb eespool olevas taandes määratletud ajavahemikule, ja tingimusel, et põld on tunnistatud vähemalt kahel järjestikusel kasvuaastal enne taimede istutamist tehtud ametlike inspekteerimiste käigus vabaks iseeneslikult kasvama läinud kartulitaimedest ja muudest organismi peremeestaimedest, lubatakse ainult tarbekartuli tootmist ning koristatud mugulaid analüüsitakse vastavalt I lisas esitatud menetlusele;
 - eelmises taandes osutatud kartulikasvatushooajale ja asjakohasele külvikordade tsüklile (mis peab olema vähemalt kaks aastat, kui seemnekartulit kasvatatakse) järgneval hooajal võib panna maha seemne- või tarbekartulit ning viiakse läbi artikli 2 lõikes 1 määratletud ametlik kontroll; või
 - ii) — saastunuks tunnistamise aastale järgneva nelja kasvatusaasta jooksul
 - võetakse meetmed iseeneslikult kasvama läinud kartulitaimede ja muude organismi looduslikult esinevate peremeestaimede kõrvaldamiseks
 - ning
 - põldu hoitakse kesa all või kasutatakse pikaajalise kultuurkarjamaana, mida sagedasti madalalt niidetakse või kasutatakse intensiivselt karjatamiseks,
 - esimesel kartuli kasvuaastal, mis järgneb eespool olevas taandes määratletud ajavahemikule, ja tingimusel, et põld on tunnistatud vähemalt kahel järjestikusel kasvuaastal enne taimede istutamist tehtud ametlike inspekteerimiste käigus vabaks iseeneslikult kasvama läinud kartulitaimedest ja muudest organismi peremeestaimedest, lubatakse seemne- või tarbekartuli tootmist ning koristatud mugulaid analüüsitakse vastavalt I lisas esitatud menetlusele;
- b) kõigil muudel saastunud tootmiskoha põldudel ning tingimusel, et vastutavad ametiasutused on kindlaks teinud, et iseeneslikult kasvama läinud kartulitaimede ja muude organismi looduslikult esinevate peremeestaimede oht on kõrvaldatud:
- saastunuks tunnistamise aastale järgneval kasvatusaastal kartulimugulaid, -taimi või -seemneid ega muid looduslikult esinevaid organismi peremeestaimi ei panda maha, istutata ega külvata, või
 - sertifitseeritud seemnekartulit võib maha panna ainult tarbekartuli kasvatamiseks,
 - teisel kasvuaastal, mis järgneb saastunuks tunnistamise aastale, pannakse maha seemne- või tarbekartuli tootmiseks ainult sertifitseeritud seemnekartulit või seemnekartulit, mida on ametlikult analüüsitud ringmädaniku puudumise suhtes ja kasvatatud ametliku kontrolli all tootmiskohtades, millele ei ole osutatud punktis 4.1,
 - vähemalt kolmandal kasvuaastal, mis järgneb saastunuks tunnistamise aastale, pannakse maha seemne- või tarbekartuli tootmiseks ainult sertifitseeritud seemnekartulit või sertifitseeritud seemnekartulist ametliku kontrolli all kasvatatud seemnekartulit,

- igal eelmistes taanetes osutatud kasvuaastal tuleb võtta meetmed iseeneslikult kasvama läinud kartulitaimede ja muude organismi looduslikult esinevate peremeestaimede kõrvaldamiseks ning teha igalt kartulipõllult koristatud kartulisaaagi ametlik analüüsimine vastavalt I lisas esitatud menetlusele;
- c) vahetult artikli 5 lõike 1 punkti a alusel saastunuks tunnistamise järel ja pärast esimest sellele järgnevat kasvutsaastat puhastatakse ja desinfitseeritakse nõuetekohaselt kõik tootmiskohas ja kartulitootmises kasutatavad masinad ja ladustamiseseadmed, kasutades punktis 3 määratletud asjakohaseid meetodeid;
- d) kaitstud tootmisala osas, kus on võimalik kasvusubstraadi täielik asendamine,
 - võib mugulaid, taimi ja seemneid maha panna, istutada ja külvata üksnes siis, kui tootmisüksuses on ametliku järelevalve all võetud meetmeid organismi kõrvaldamiseks ja mis tahes peremeestaimede kõrvaldamiseks, sealhulgas vähemalt täielik kasvusubstraadi asendamine ning tootmisüksuse ja kõikide seadmete puhastamine ja desinfitseerimine, ning vastutavad ametiasutused on seejärel kartulikasvatuse heaks kiitnud, ning
 - kasvatatakse kartuleid sertifitseeritud seemnekartulist või minimugulatest või mikrotaimedest, mis pärinevad kontrollitud allikatest;

4.2. Ilma et see piiraks punktis 4.1 määratletud meetmeid, peavad liikmesriigid piiritletud tsoonis:

- a) viivitamata pärast saastunuks tunnistamist puhastama ja desinfitseerima nõuetekohaselt nendes kohtades kõik kartuli tootmisel kasutatavad masinad ja ladustamiseseadmed, kasutades punktis 3 määratletud asjakohaseid meetodeid;
- b) viivitamata ja vähemalt kolme kasvatushooaja jooksul pärast saastunuks tunnistamist:
 - tagama oma vastutavate ametiasutuste järelevalve kartulimugulate kasvatus-, ladustamis- või käitlemisettevõtete üle ning lepingu alusel kartulikasvatusseadmeid kasutavate ettevõtete üle,
 - nõudma selles tsoonis kartuli tootmiseks ainult sertifitseeritud seemnekartuli või sellise seemnekartuli maha panemist, mida on kasvatatud ametliku kontrolli all, ning pärast saagikoristust selle seemnekartuli laboratoorset analüüsimist, mis on kasvatatud artikli 5 lõike 1 punkti b alusel tõenäoliselt saastunuks tunnistatud kohtades,
 - nõudma koristatud seemnekartuli varude tarbekartulist eraldi käitlemist kõikides ettevõtetes selles tsoonis või puhastamist ja desinfitseerimist, mis tehakse seemnekartuli ja tarbekartuli käitlemise vahel,
 - viima läbi ametliku seire, mis on määratletud artikli 2 lõikes 1;
- c) kehtestama vajaduse korral kava kõikide seemnekartuli varude asendamiseks asjakohase ajavahemiku jooksul.

V LISA

Ametlikult heaks kiidetud jäätmete kõrvaldamise meetodid, millele on osutatud IV lisa lõikes 1, peavad organismi mistahes identifitseeritava levikuohu vältimiseks vastama järgmistele tingimustele:

- i) kartulite jäätmed (sh väljapraagitud kartulid ja kartulikoores) ning muud kartulitega seotud tahked jäätmed (sh pinnas, kivid ja muu prügi) tuleb kas
 - kõrvaldada ametlikult heaks kiidetud jäätmekäitluskohas, kus ei teki organismi keskkonda pääsemise identifitseeritavat riski nt põllumajandusmaasse imbumise kaudu. Jäätmed tuleb toimetada otse jäätmekäitlusk kohta sellistes isoleeritud tingimustes, et ei ole ohtu jäätmete kadumiseks,või
 - tuhastada,või
 - kõrvaldada muid meetmeid kasutades, tingimusel et on kindlaks tehtud, et ei ole organismi leviku identifitseeritavat ohtu; sellistest meetmetest ja nende põhjendustest tuleb teatada komisjonile ja teistele liikmesriikidele;
- ii) vedelad jäätmed: enne äravoolu tuleb hõljuvaineid sisaldavad vedelad jäätmed filtreerida või setitada selliste ainete eemaldamiseks. Need ained tuleb kõrvaldada vastavalt lõigus i sätestatule.

Vedelad jäätmed tuleb seejärel kas:

- enne kõrvaldamist kuumutada vähemalt 60 °C-ni vähemalt 30 minuti jooksul,
- või
- kõrvaldada muul ametlikult heaks kiidetud viisil ja ametliku järelevalve all, nii et ei ole identifitseeritavat riski jäätmete kokkupuuteks põllumajandusmaaga. Nende meetmete üksikasjadest teavitatakse teisi liikmesriike ja komisjoni.

Käesolevas lisas kirjeldatud võimalusi kohaldatakse ka saastunud partiide käitlemise, kõrvaldamise ja töötlemisega seotud jäätmete suhtes.