

Eiropas Savienības

L 182

Oficiālais Vēstnesis

Izdevums
latviešu valodā

Tiesību akti

49. sējums
2006. gada 4. jūlijs

Saturs

I Tiesību akti, kuru publicēšana ir obligāta

- ★ Komisijas Direktīva 2006/56/EK (2006. gada 12. jūnijs), ar ko groza pielikumus Padomes Direktīvā 93/85/EEK par kartupeļu gaišās gredzenpuves kontroli 1

I

(Tiesību akti, kuru publicēšana ir obligāta)

KOMISIJAS DIREKTĪVA 2006/56/EK

(2006. gada 12. jūnijs),

ar ko groza pielikumus Padomes Direktīvā 93/85/EEK par kartupeļu gaišās gredzenpuves kontroli

EIROPAS KOPIENU KOMISIJA,

ņemot vērā Eiropas Kopienas dibināšanas līgumu,

ņemot vērā Padomes 1993. gada 4. oktobra Direktīvu 93/85/EEK ⁽¹⁾ par kartupeļu gaišās gredzenpuves kontroli, un jo īpaši tās 12. pantu,

tā kā:

(1) Viens no kartupeļiem īpaši kaitīgiem organismiem, kas izraisa kartupeļu gredzenpuvi, ir *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kott-hoff) Davis et al. (turpmāk tekstā "organisms").

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

(3) Ar Padomes Direktīvu 93/85/EEK ir pieņemti sīki izstrādāti pasākumi, kas dalībvalstīs jāpieņem attiecībā uz šo organismu, lai noteiktu tā atrašanās vietu un izplatību, nepieļautu tā parādīšanos un izplatīšanos, un, konstatējot šo organismu, nepieļautu izplatīšanos, un to apkarotu vai izskaustu.

(4) Kopš direktīvas pieņemšanas būtiski mainījusies izpratne par šī organisma bioloģiju, noteikšanas un identifikācijas procedūrām. Turklāt atbilstīgi pieredzei, kas gūta, īstenojot organisma kontroles pasākumus, ir jāpārskata daži ar kontroles pasākumiem saistīti tehniski noteikumi.

(5) Sakarā ar šīm izmaiņām ir jāpārskata un jāatjaunina pasākumi, kas iekļauti Direktīvas 93/85/EEK pielikumos.

(6) Attiecībā uz noteikšanas un identifikācijas procedūrām ir iekļautas nesen izstrādātas procedūras, piemēram, *in situ* fluorescences hibrizācija (FISH) un polimerāzes ķēdes reakcija (PCR), kā arī pašreizējo noteikšanas un identifikācijas procedūru dažādu tehnisko elementu uzlabojumi.

(7) Pilnveidoti ar kontroles pasākumu tehniskajiem elementiem saistītie nosacījumi attiecībā uz pārbaudīto paraugu konservācijas veidu, lai nodrošinātu organisma izsekojamību, noteikumi par elementiem, kas nepieciešami potenciālās inficēšanās pakāpes noteikšanai, precizēta informācija, kas ikreiz, kad apstiprināta organisma klātbūtne, jāsniedz šajā sakarā un par attiecīgo inficēto teritoriju, pasākumiem, kas īstenojami ražošanas vietās, kuras atzītas par inficētām, un norobežojošajās zonās ap tām.

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

IR PIEŅĒMUSI ŠO DIREKTĪVU.

1. pants

Ar šo Direktīvas 93/85/EEK pielikumus aizstāj ar atbilstošajiem tekstiem šīs direktīvas pielikumā.

2. pants

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

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

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

(¹) OV L 259, 18.10.1993., 2. lpp.

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

4. pants

Šī direktīva ir adresēta dalībvalstīm.

3. pants

Briselē, 2006. gada 12. jūnijā

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

Komisijas vārdā –
Komisijas loceklis
Markos KYPRIANOU

I PIELIKUMS

GAIŠĀS GREDZENPUVES IZRAISĪTĀJAS BAKTĒRIJAS *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* (Smith) Davis *et al.* ssp. *SEPEDONICUS* (Spieckermann *et* Kotthof) Davis *et al.* DIAGNOSTIKAS, NOTEIKŠANAS UN IDENTIFIKĀCIJAS TESTĒŠANAS SHĒMA**TESTĒŠANAS SHĒMAS DARBĪBAS JOMA**

Turpmākajā shēmā aprakstītas dažādas procedūras, kas saistītas ar:

- i) gaišās gredzenpuves diagnosticēšanu kartupeļu bumbuļos un lakstos;
- ii) *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* konstatēšanu kartupeļu bumbuļos un lakstos;
- iii) *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*C. m.* subsp. *sepedonicus*) identificēšanu.

VISPĀRĪGI PRINCIPI

Papildinājumos iekļauti metožu optimizētie protokoli, ziņas par validētiem reaģentiem, testu sagatavošanu un kontroles materiāliem. Protokolu optimizācijas un validācijas procesā iesaistīto laboratoriju saraksts noteikts 1. papildinājumā.

Tā kā protokolos paredzēts, ka ir jānosaka bīstams karantīnas organisms, un tajos paredzēta dzīvotspējīgu *C. m.* subsp. *sepedonicus* kultūru izmantošana kontroles materiāla veidā, procedūras īstenojamas piemērotos karantīnas apstākļos ar atbilstošu atkritumu iznīcināšanu un ievērojot attiecīgas licences noteikumus, kuru izsniegusi oficiāla augu karantīnas iestāde.

Testēšanas parametriem jānodrošina sistēmiska un reproducējama *C. m.* subsp. *sepedonicus* līmeņa noteikšana, ievērojot izvēlētajām metodēm noteiktos sliekšņus.

Pozitīvo kontrolparaugu precīza sagatavošana ir obligāta.

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

Kā minēts 4. panta 2. punktā Direktīvā 93/85/EEK, aizdomas par organisma parādīšanos nozīmē pozitīvu rezultātu diagnosticēšanas vai skrīninga testos, kas veikti attiecībā uz paraugu, kā tas ir norādīts shēmās.

Ja pirmais skrīninga tests (*IF* vai *PCR/FISH*) ir pozitīvs, pastāv aizdomas par inficēšanos ar *Cms*, un jāveic otrs skrīninga tests. Ja otrais skrīninga tests ir pozitīvs, tad aizdomas apstiprinās (aizdomas par organisma klātbūtni), un jāturpina testēšana atbilstoši shēmai. Ja otrais skrīninga tests ir negatīvs, uzskata, ka paraugs nav inficēts ar *Cms*.

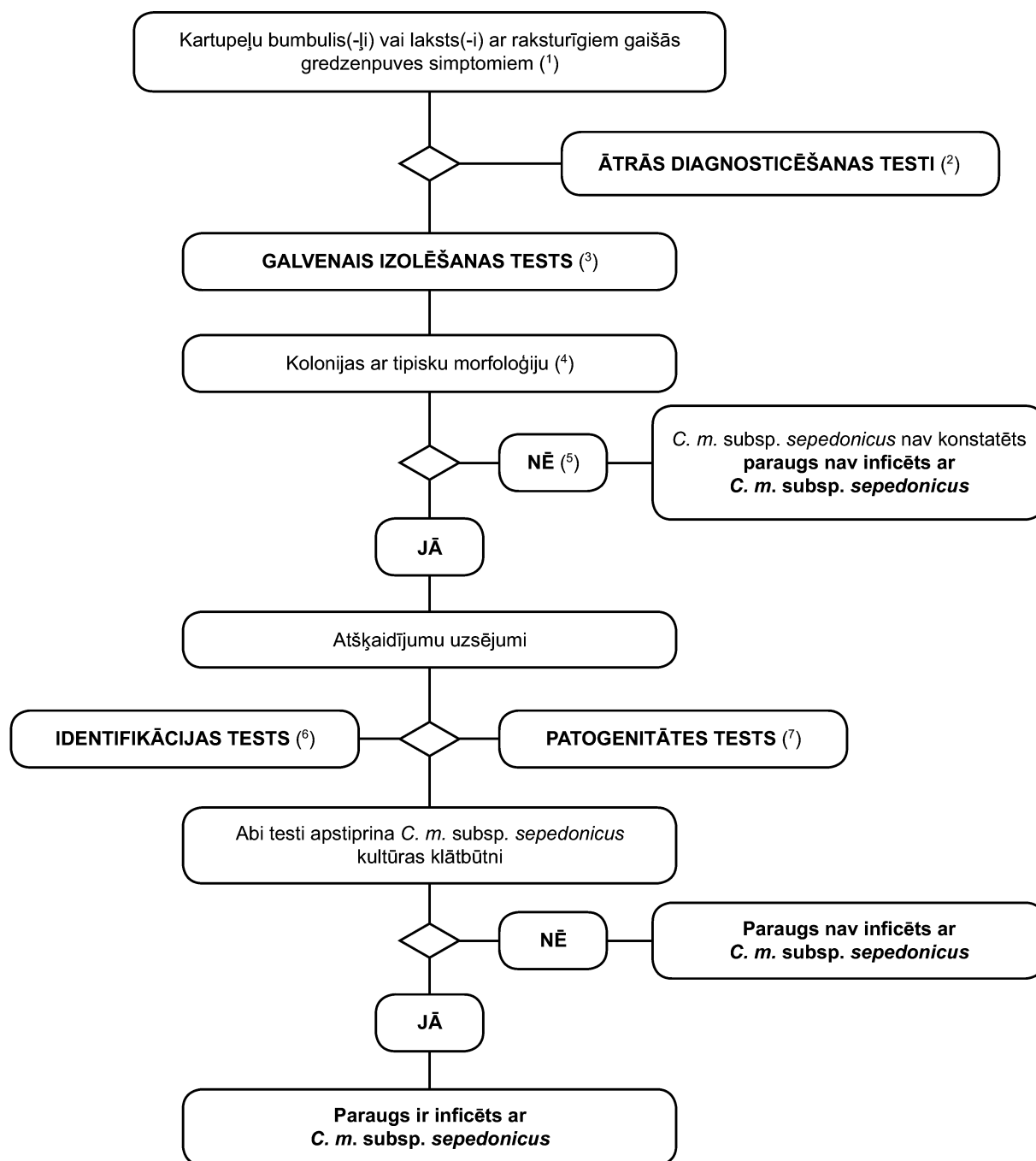
Tādēļ pozitīvs *IF* tests, kā minēts 4. panta 2. punktā, ir definēts kā pozitīvs *IF* nolasījums, ko apstiprina otrais skrīninga tests (*PCR/FISH*).

Saskaņā ar 5. panta 1. punktu Direktīvā 93/85/EEK apstiprināta klātbūtne paredz *C. m.* subsp. *sepedonicus* tīrkultūras izolēšanu un identifikāciju, apstiprinot patogenitāti.

1. SHĒMA

1.1. **Kartupeļu gaišās gredzenpuves noteikšanas shēma tās diagnosticēšanai tādu kartupeļu bumbuļos un lakstos, kuriem ir gaišās gredzenpuves simptomi**

Testa procedūra paredzēta kartupeļu bumbuļiem un lakstiem, kuriem ir gaišajai gredzenpuvei raksturīgi simptomi vai attiecībā uz ko ir aizdomas par inficēšanos ar to. Tā ietver ātro skrīninga testu, patogēna izolēšanu no inficētajiem vadaudiem diagnostikas barotnē, un, ja iegūts pozitīvs rezultāts, kultūras identificēšanu kā *C. m.* subsp. *sepedonicus*.



(1) Simptomu apraksts sniegts 2. sadaļā.

(2) Atbilstošie testi ir šādi:
 — IF tests (4. sadaļa),
 — PCR tests (6. sadaļa),
 — FISH tests (5. sadaļa).

(3) Kaut arī patogēnu ir ļoti vienkārši izolēt no augu materiāla ar raksturīgiem simptomiem, izmantojot atšķaidījuma uzsējumu, vēlākās infekcijas fāzēs var neizdoties kultūras audzēšana. Saprofītās baktērijas, kas attīstās inficētos audos, var pāraugt patogēnu vai nomākt to izolēšanas barotnē. Tāpēc ir ieteicams izmantot gan neselektīvo, gan selektīvo barotni, vēlams *MTNA* (8. sadaļa), vai biopatogenitātes testu (7. sadaļa).

(4) Kolonijas tipiskā morfoloģija aprakstīta 8. sadaļā.

(5) Ja izolācijas tests ir negatīvs, bet novērojami raksturīgie slimības simptomi, izolācija jāatkārto.

(6) *C. m. subsp. sepedonicus* fīrkkultūras droša identificēšana tiek panākta, izmantojot testus, kas uzskaitīti 9. sadaļā.

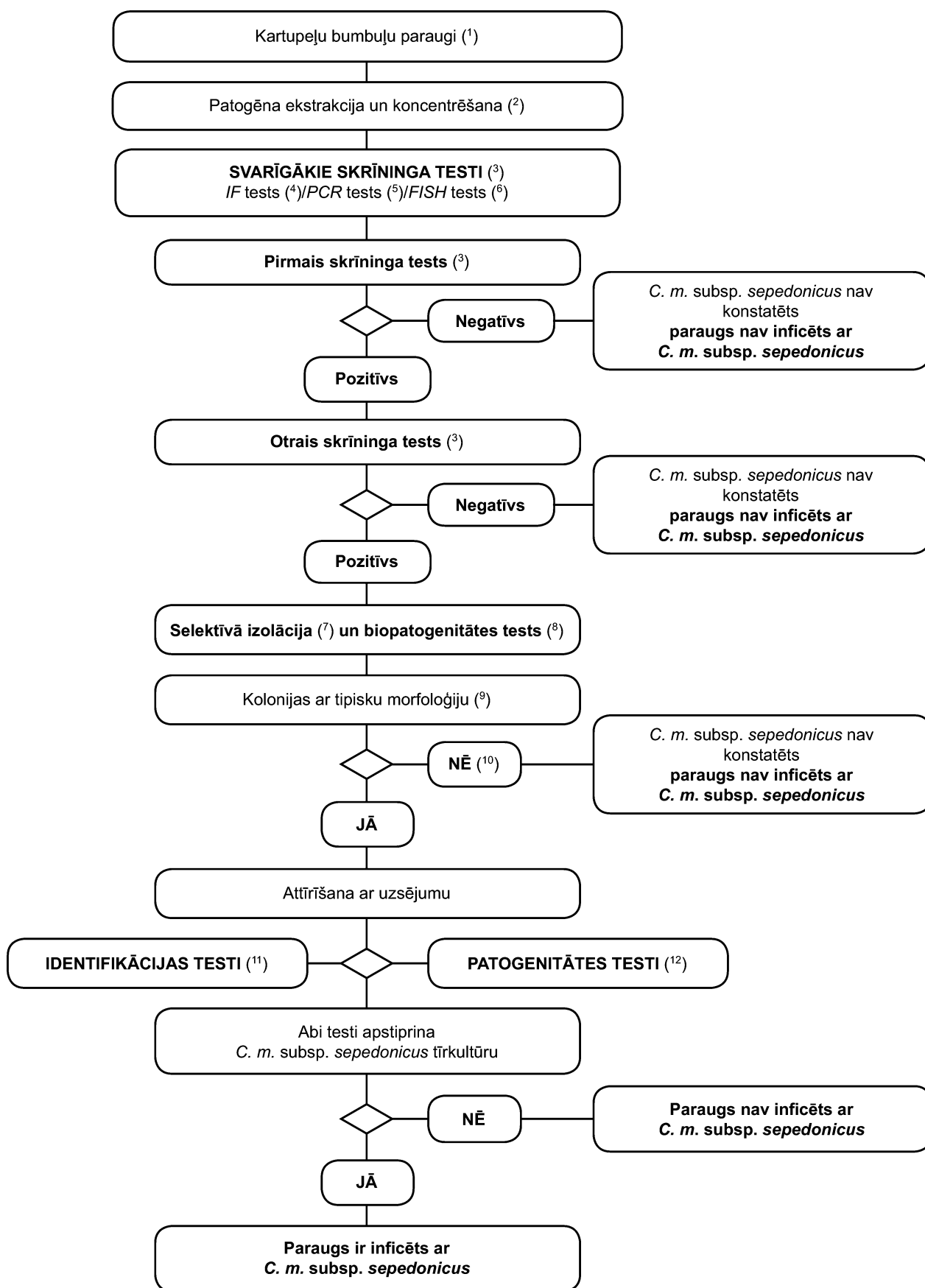
(7) Patogenitātes tests aprakstīts 10. sadaļā.

1.2. ***Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* noteikšanas un identifikācijas shēma asimptomātiskos kartupeļu bumbuļu paraugos**

Princips

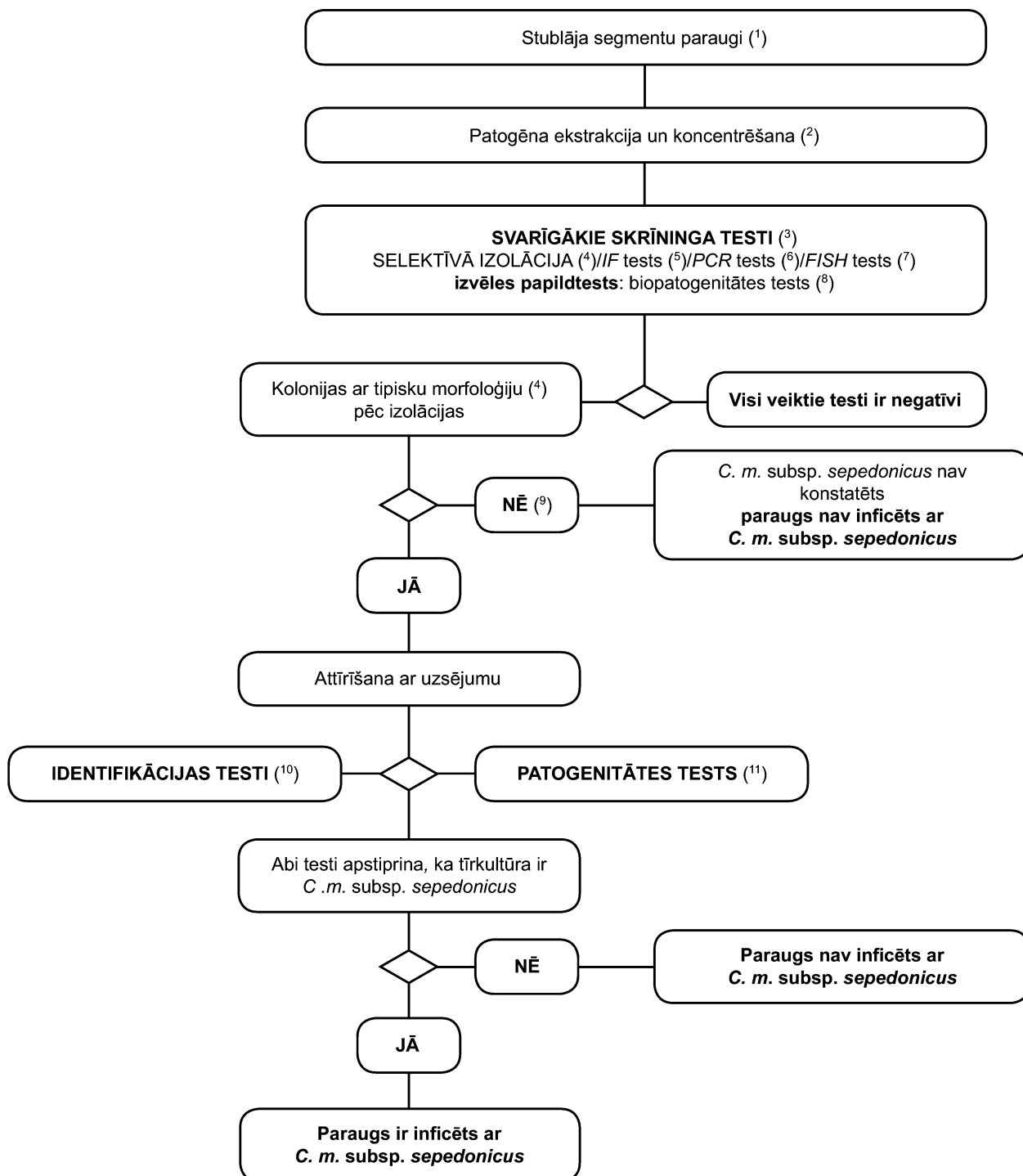
Testēšanas procedūra paredzēta latentu infekciju noteikšanai kartupeļu bumbuļos. Vismaz divu uz dažādiem bioloģiskiem principiem balstītu skrīninga testu pozitīvs rezultāts ir jāapstiprina ar patogēna izolāciju; tipisku koloniju izolācijas gadījumā tam seko *C. m.* subsp. *sepedonicus* tīrkultūras apstiprināšana. Tikai ar viena skrīninga testa pozitīvu rezultātu nepietiek, lai uzskatītu, ka pastāv aizdomas par parauga inficēšanos.

Skrīninga un izolācijas testos noteikšanas sliekšnim ir jābūt robežās no 10^3 līdz 10^4 šūnas mililitrā atkārtoti suspendēta ekstrakta koncentrāta, ko katrā testu sērijā iekļauj kā pozitīvo kontrolparaugu.



- (¹) Standarta paraugs ir 200 bumbuļi, ja nav 200 bumbuļu, procedūru var īstenot ar mazākiem paraugiem.
- (²) Patogēna ekstrakcijas un koncentrēšanas metodes aprakstītas 3.1. sadaļā.
- (³) Ja pozitīvi ir vismaz divi testi, kas balstās uz atšķirīgiem bioloģiskajiem principiem, jāzdrada izolācijas un apstiprināšanas pārbaudes. Jāveic vismaz viens skrīninga tests. Ja šā testa rezultāts ir negatīvs, uzskata, ka paraugs nav inficēts. Ja testa rezultāts ir pozitīvs, pirmā pozitīvā rezultāta pārbaudei jāveic otrs skrīninga tests vai vairāki testi, kas balstīti uz citiem bioloģiskajiem principiem. Ja otrā testa vai nākamā testa rezultāti ir negatīvi, uzskata, ka paraugs nav inficēts. Turpmāki testi nav nepieciešami.
- (⁴) Imunofluorescences (*IF*) tests.
IF testiem jāizmanto poliklonālās antivielas; papildus monoklonālo antivielu izmantošana var nodrošināt lielāku specifiskumu (sk. 4. sadaļu).
- (⁵) *PCR* tests.
Jāizmanto attiecīgi validēti *PCR* reaģenti un protokoli (sk. 6. sadaļu).
- (⁶) *FISH* tests.
Jāizmanto validēti reaģenti un protokoli (sk. 5. sadaļu).
- (⁷) Selektīvā izolācija.
Pateicoties tam, ka tiek izmantota *MTNA* barotne vai *NCP-88* barotne un atkārtoti suspendēta ekstrakta koncentrāta šķīdums attiecībā 1/100, šī ir piemērota metode tiešai *C. m. subsp. sepedonicus* izolēšanai. Tipiskas kolonijas var iegūt aptuveni 3–10 dienas pēc uzsējuma. Tad patogēnu var attīrīt un identificēt. Lai pilnībā izmantotu testa potenciālu, rūpīgi sagatavot bumbuļu pamatnes serdes, lai novērstu tādu sekundāru ar kartupeļu bumbuļiem saistītu baktēriju parādīšanos, kas barotnē konkurē ar *C. m. subsp. sepedonicus* un var pārāugt patogēnu. Ja plates tests neizdodas, jāveic izolācija no augiem, kurus izmanto biopatogenitātes testam (sk. 8. sadaļu).
- (⁸) Biopatogenitātes testu izmanto, lai no kartupeļu ekstrakta izolētu *C. m. subsp. sepedonicus*, veicot selektīvu bagātināšanu uz baklažānu augiem (*Solanum melongena*). Šim testam vajadzīgi optimāli inkubācijas apstākļi, kas noteikti šai metodei. Visticamāk, ka baktērijas, kas *C. m. subsp. sepedonicus* nomāc *MTNA* un *NCP-88* barotnē, šā testa norisi neietekmē (sk. 7. sadaļu).
- (⁹) Kolonijas tipiskā morfoloģija aprakstīta 8. sadaļā.
- (¹⁰) Uzsējums vai biopatogenitātes tests var neizdoties, ja saprofitās baktērijas gūst pārsvaru vai to inhibē. Ja skrīninga testi uzrāda pozitīvus rezultātus, bet izolācijas testu rezultāts ir negatīvs, izolācijas testi jāatkārto, izmantojot to pašu ekstraktu vai no tā paša parauga papildus ņemot vadaudus blakus sagrieztā bumbuļa stolona pamatnei, un nepieciešamības gadījumā pārbaudot papildu paraugus.
- (¹¹) Iespējamās *C. m. subsp. sepedonicus* tīrkultūras droša identificēšana tiek panākta, izmantojot testus, kas aprakstīti 9. sadaļā.
- (¹²) Patogenitātes tests aprakstīts 10. sadaļā.

- 1.3. *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* noteikšanas un identifikācijas shēma asimptomātiskos kartupeļu lakstu paraugos



- (¹) Ieteicamais paraugu lielums norādīts 3.2. sadaļā.
- (²) Patogēna ekstrakcijas un koncentrācijas metodes ir aprakstītas 3.2. sadaļā.
- (³) Ja pozitīvi ir vismaz divi testi, kas balstīti uz atšķirīgiem bioloģiskajiem principiem, jāveic izolācijas un apstiprināšanas pārbaudes. Jāveic vismaz viens skrīninga tests. Ja šā testa rezultāts ir negatīvs, uzskata, ka paraugs nav inficēts. Ja šā testa rezultāts ir pozitīvs, pirmā pozitīvā rezultāta apstiprināšanai nepieciešams veikt vienu vai vairākus skrīninga testus, kuri balstīti uz dažādiem bioloģiskajiem principiem. Ja otrā testa vai nākamā testu rezultāti ir negatīvi, uzskata, ka paraugs nav inficēts. Turpmāki testi nav nepieciešami.
- (⁴) Selektīvās izolācijas tests un kolonijas tipiskā morfoloģija ir aprakstīta 8. sadaļā.
- (⁵) *IF* tests aprakstīts 4. sadaļā.
- (⁶) *PCR* tests aprakstīts 6. sadaļā.
- (⁷) *FISH* tests aprakstīts 5. sadaļā.
- (⁸) Biopatogenitātes tests aprakstīts 7. sadaļā.
- (⁹) Uzsējums vai biopatogenitātes tests var neizdoties, ja saproftās baktērijas gūst pārsvaru vai to inhibē. Ja skrīninga testu rezultāti ir pozitīvi, bet izolācijas testu rezultāti ir negatīvi, izolācijas testus atkārtoti, un vajadzības gadījumā testē papildu paraugus.
- (¹⁰) Iespējamās *C. m. subsp. sepedonicus* tīrkultūras droša identificēšana tiek panākta, izmantojot 9. sadaļā aprakstītos testus.
- (¹¹) Patogenitātes tests aprakstīts 10. sadaļā.

2. GAIŠĀS GREDZENPUVES SIMPTOMU VIZUĀLA NOTEIKŠANA

2.1. Kartupeļu laksti

Eiropas klimatiskajos apstākļos simptomi ir novērojami reti, un parasti tie kļūst redzami tikai sezonas beigās. Turklāt simptomi parasti ir slēpti, vai tos jāauc ar citu slimību simptomiem, vecuma pazīmēm vai mehāniskiem bojājumiem. Tādēļ apskatē uz lauka simptomus var viegli neievērot. Vītes simptomi ievērojami atšķiras no tumšās gredzenpuves simptomiem; vīte parasti noris lēni un tā redzama tikai uz lapu malām. Jaunas inficētas lapas bieži turpina attīstīties, kaut arī mazāk nekā zonās, kuras nav inficētas. Tādējādi rodas neparastas formas lapas. Lapām, kuras vadaudu bloķēšana skārusi zemāk uz stublāja, vidusdaļa bieži ir hlorotiska, dzeltena vai oranža. Beigās inficētas lapas un pat stublāji var atmirēt. Bieži lapas un bumbuļi ir vienkārši mazāki pēc izmēra. Dažkārt augi ir nīkulīgi. Iespējamo simptomu krāsaini attēli ir atrodamā Komisijas tīmekļa vietnē <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

2.2. Kartupeļu bumbuļi

Agrīnās pazīmes ir viegls aužu stiklainums vai caurspīdīgums ap vadaudu sistēmu bez aužu mīkstināšanās, jo īpaši tuvāk stolona pamatnei. Vadaudu gredzena krāsa pie stolona pamatnes var būt nedaudz tumšāka nekā parasti. Pirmā viegli nosakāmā pazīme ir vadaudu gredzena dzeltenīgā krāsa un sierveida masas strūklveida izdalīšanās no bumbuļa vadaudiem, viegli saspiežot bumbuļi. Šis eksudāts satur miljoniem baktēriju. Šajā slimības stadijā vadaudi var kļūt brūngani, un bumbuļu simptomi šajā stadijā ir līdzīgi *Ralstonia solanacearum* izraisītās tumšās gredzenpuves simptomiem. Sākumā šīs pazīmes var būt vērojamas tikai vienā vadaudu gredzena daļā, kas var nebūt tuvu pie stolona pamatnes, bet ar laiku pakāpeniski izplatīties visā vadaudu gredzenā. Infekcijai izplatoties, notiek vadaudu sairšana; mizas un ārējo aužu slānis var atdalīties no iekšējo aužu slāņa. Slimības vēlīnajās stadijās bumbuļu virsmā parādās plaisas, parasti ar sarkanīgi brūnas krāsas malām. Pēdējā laikā Eiropā ir konstatēti vairāki gadījumi, kad vidējais mizas slānis pūst vienlaicīgi ar vadaudu gredzenu, izraisot sekundāru infekciju ar iekšējo dobumu veidošanos un nekrozi. Sekundāra sēnīšu vai baktēriju infekcija var apslēpt slimības pazīmes, un tādēļ var būt grūti vai pat neiespējami atšķirt kartupeļu gaišās gredzenpuves vēlīnās stadijas pazīmes no kādas citas bumbuļu puves. Iespējami arī atipiski simptomi. Iespējamo simptomu krāsaini attēli ir atrodamā Komisijas tīmekļa vietnē <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

3. PARAUGU SAGATAVOŠANA

3.1. Kartupeļu bumbuļi

Piezīme:

- Standarta paraugs ir 200 bumbuļi katram testam. Intensīvākai paraugu ņemšanai nepieciešami papildu testi, izmantojot šāda lieluma paraugu. Ja bumbuļu skaits paraugā ir lielāks, iespējams, tests nedos rezultātus vai tie būs grūti interpretējami. Tomēr, ja nav pieejams nepieciešamais daudzums, šī procedūra labi izmantojama arī paraugiem, kuros ir mazāk nekā 200 bumbuļi.
- Visas turpmāk aprakstītās metodes validētas, testējot paraugus no 200 bumbuļiem.
- Turpmāk aprakstīto kartupeļu ekstraktu var izmantot arī kartupeļu tumšās gredzenpuves baktēriju *Ralstonia solanacearum* noteikšanai.

Papildu pirmapstrāde pirms parauga sagatavošanas:

Nomazgāt kartupeļu bumbuļus. Izmantot atbilstošus dezinfekcijas līdzekļus (ja veic PCR testu, izmanto hlora savienojumus, lai notīrītu iespējamo patogēna DNS) un mazgāšanas līdzekļus katram paraugam. Ļaut bumbuļiem nožūt. Mazgāšana ir īpaši lietderīga (taču nav obligāta) paraugiem, uz kuriem ir lieka augsnes kārtā, un gadījumos, ja jāveic PCR tests vai tiešās izolācijas tests.

- 3.1.1. Ar tīru dezinficētu skalpeli vai dārzena nazi noņemt mizu pie katra bumbuļa stolona pamatnes, atsedzot vadaudus. Uzmaniģi izgriezt nelielu vadaudu gabalu no stolona pamatnes, cenšoties izgriezt pēc iespējas mazāk bumbuļa mikstuma (sk. tīmekļa vietnē <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Piezīme:

Atlasīt visus bumbuļus, kuriem ir gaišās gredzenpuves iespējami simptomi, un testēt tos atsevišķi.

Ja stolona pamatnes vidus gabala atdalīšanas laikā redzami gaišās gredzenpuves simptomi, jāveic attiecīgā bumbuļa vizuāla pārbaude, bumbuli iegriežot pie stolona pamatnes. Visus bumbulus, kuriem ir attiecīgi gredzenpuves simptomi, ne mazāk kā 2 dienas glabā istabas temperatūrā, lai notiktu pārkoksšanās, pēc tam bumbuļi jāglabā vēsumā (4–10 °C temperatūrā) karantīnā līdz testēšanas beigām. Visi bumbuļi, tostarp tie, kuriem ir aizdomīgi simptomi, jāuzglabā, kā noteikts II pielikumā.

3.1.2. Savākt stolona pamatnes vidus gabalus jaunos vienreizlietojamus konteineros, kurus var aizvērt un/vai cieši noslēgt (ja izmanto vairākkārt lietojamus traukus, tie ir rūpīgi jāiztīra un jādezinficē ar hloru saturošiem savienojumiem). Stolona pamatnes ieteicams apstrādāt nekavējoties. Ja tas nav iespējams, tās ne ilgāk kā 72 stundas atvēsinātā veidā un ne vairāk kā 24 stundas istabas temperatūrā var konteinerā uzglabāt, nepievienojot buferšķidrumu. Vadaudu gabalu izžūšana, pārkoksšanās un saprofitu augšana uzglabāšanas laikā var traucēt gaišās gredzenpuves izraisītās baktērijas noteikšanu.

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

a) stolona pamatnes vadaudu gabalus pārliet ar pietiekamu daudzumu ekstrakcijas buferšķidruma (apm. 40 ml) (3. papildinājums) un 4 stundas kratīt rotācijas kratītājā (50–100 apgr./min) temperatūrā, kas zemāka par 24 °C, vai 16–24 stundas gadījumā, ja tie ir atdzēsēti,

vai

b) vadaudu gabalus homogenizēt mikserī (*Waring* vai *Ultra Thurax*), ar pietiekamu (apm. 40 ml) daudzumu ekstrakcijas buferšķidruma (3. papildinājums), vai ar gumijas āmuru vai atbilstošu smalcinātāju (piemēram, *Homex*) sasmalcināt cieši noslēgtā vienreizlietojamā macerācijas maisiņā (piem., *Stomacher* vai *Bioreba* jonizējošā starojumā sterilizētā polietilēna 150 mm × 250 mm maisiņā).

Piezīme:

Ja paraugi tiek homogenizēti mikserī, savstarpējas inficēšanās risks ir ļoti augsts. Veic piesardzības pasākumus, lai izvairītos no aerosola veidošanās vai izlīšanas ekstrakcijas procesa laikā. Nodrošina, ka katram paraugam tiek izmantoti sterilizēti miksera asmeņi un trauki. Ja jāveic PCR tests, jāizvairās no DNS pārnesēšanas uz traukiem vai smalcināšanas ierīcēm. PCR testam sasmalcināšanu veic vienreizlietojamos maisiņos vai traukos.

3.1.4. Virsējo dzidro šķidruma slāni dekantēt. Ja šķidrums ir pārāk duļķains, tas jādzidrina, lēni centrifugējot (10 min 4–10 °C temperatūrā, ne vairāk kā ar 180 g) vai izmantojot vakuūmfiltrēšanu (40–100 μm) un mazgājot filtru ar papildu ekstrakcijas šķidrumu (10ml) (3. papildinājums).

3.1.5. Koncentrēt baktēriju frakcijas, 4–10 °C temperatūrā 15 min centrifugējot ar 7 000 g (vai 10 min ar 10 000 g), virsējo dzidro šķidruma slāni dekantēt, neuzduļķojot nogulsnes.

3.1.6. Nogulsnes vēlreiz suspendēt 1,5 ml buferšķidruma (3. papildinājums). Izmantot 500 μl *C. m. subsp. sepedonicus* testēšanai, un 500 μl *Ralstonia solanacearum* un 500 μl references vajadzībām. References alikvotai un atlikušajai testa alikvotai pievienot sterilu glicerīnu, līdz galīgai koncentrācijai 10–25 % (v/v), 500 μl, sajaukt un glabāt –16 līdz –24 °C temperatūrā (nedēļas) vai –68 līdz –86 °C (mēnešus). Testēšanas laikā alikvotas glabāt 4–10 °C temperatūrā.

Atkārtoti sasaldēt un atkausēt nav ieteicams.

Ja ekstraktu transportē, tas jāpārvadā aukstumkastē 24–48 stundu laikā.

3.1.7. *C. m. subsp. sepedonicus* pozitīvie kontrolparaugi un paraugi obligāti jāapstrādā atsevišķi, lai izvairītos no inficēšanās. Tas attiecas uz IF priekšmetstikliņiem un uz visiem testiem.

3.2. Kartupeļu laksti

Piezīme:

Lai noteiktu latentas *C. m. subsp. sepedonicus* populācijas, ieteicams testēt apvienotos paraugus. Procedūru var izmantot arī apvienotiem paraugiem no ne vairāk kā 200 stublāju daļām. (Apsekojumos jāizmanto statistiski reprezentatīvi izmeklējamas augu populācijas paraugi.)

3.2.1. Ar tīru dezinficētu nazi vai atzarošanas šķērēm atdalīt 1–2 cm lielu segmentu no katra stublāja pamata pavisam nedaudz virs augsnes līmeņa.

Neilgu laiku dezinficēt stublāju segmentus ar 70 % metanolu un nekavējoties nosusināt ar papīra salveti.

Ieliklīt stublāju segmentus slēgtā sterilā traukā, ievērojot šādas paraugu ņemšanas procedūras:

3.2.2. Apstrādāt stumbru segmentus pēc vienas no turpmāk minētajām metodēm:

a) apliet stublāju segmentus ar pietiekamu daudzumu (aptuveni 40 ml) ekstrakcijas buferšķīduma (3. papildinājums) un kratīt rotācijas kratītājā (50–100 apgr./min) 4 stundas temperatūrā zem 24 °C vai 16–24 stundas atvēsinātā veidā,

vai

b) apstrādāt nekavējoties. Stublāju segmentus homogenizēt ar daudzumu ekstrakcijas šķīdumu (3. papildinājums) izturīgā macerācijas maisīnā (piemēram, *Stomacher* vai *Bioreba*), sasmalcinot tos ar gumijas āmuru vai atbilstošu smalcinātāju (piemēram, *Homex*). Ja uzreiz apstrādāt nevar, stublāju segmentus vēsumā var uzglabāt līdz 72 stundām, bet istabas temperatūrā – līdz 24 stundām.

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

3.2.4. Baktēriju frakcijas ekstraktu vai koncentrātu parasti nav nepieciešams papildus dzidrināt, bet to var izdarīt filtrējot un/vai centrifugējot, kā aprakstīts 3.1.4.–3.1.6. sadaļā.

3.2.5. Sadalīt neatšķaidīto vai koncentrēto parauga ekstraktu 2 vienādās daļās. Vienu daļu uzglabāt 4–10 °C temperatūrā visu testa laiku, otru daļu, ja nepieciešama turpmāka testēšana, pēc 10–25 % (v/v) sterila glicerīna pievienošanas glabāt – 16 līdz – 24 °C temperatūrā (nedēļām ilgi) vai – 68 līdz – 86 °C temperatūrā (mēnešiem).

4. IF TESTS

Principi

IF testu ieteicams izmantot par galveno skrīninga testu, jo ir pierādīts tā robustums nepieciešamo sliekšņu sasniegšanai.

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

Piezīme:

Ja par galveno skrīninga testu izmanto IF testu, noteikti jālieto poliklonālā antivielas. Gadījumā, ja IF testam ar poliklonālo antivielu ir pozitīvs rezultāts, papildus skrīningam ar monoklonālo antivielu var būt labāks specifiskums, bet zemāka jutība.

Jāizmanto *C. m. subsp. sepedonicus* references celma antivielas. Ieteicams noteikt titru katrai jaunai antivielu partijai. Titrs tiek definēts kā vislielākais atšķaidījums, pie kura panāk optimālu reakciju, testējot suspensiju, kuras vienā mililitrā ir 10^5 līdz 10^6 homologa *C. m. subsp. sepedonicus* celma šūnu, un saskaņā ar ražotāja norādījumiem izmantojot atbilstošu fluoresceīna izotiocianāta (FITC) konjugātu. Neattīrītu poliklonālo un monoklonālo antivielu IF titram jābūt vismaz 1:2 000. Testēšanas laikā antivielas jāizmanto darba atšķaidījumā (DA), kas vienāds ar titru vai tam tuvu. Izmantot validētas antivielas (sk. tīmekļa vietnē <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Testu veic, izmantojot tikko sagatavotus paraugu ekstraktus. Nepieciešamības gadījumā testu var sekmīgi veikt, izmantojot ekstraktus, kas glabāti – 68 līdz – 86 °C temperatūrā glicerīna šķīdumā. Glicerīnu no parauga atdala, pievienojot 1 ml ekstrakta koncentrāta buferšķīduma (4. papildinājums), atkārtoti 15 min centrifugējot ar 7 000 g un vēlreiz suspendējot tāda paša daudzuma ekstrakta koncentrāta buferšķīdumā. Dažkārt tas nav nepieciešams, jo īpaši, ja paraugs ir fiksēts uz priekšmetstikliņa ar liesmu (sk. 2.2.).

Sagatavot atsevišķus pozitīvās kontroles priekšmetstikliņus homologam celmam vai kādam citam references *C. m. subsp. sepedonicus* celmam, suspendējot kartupeļu ekstraktā, kā noteikts 2. papildinājumā, vai buferšķīdumā.

Ja iespējams, uz tā paša priekšmetstikliņa par līdzīgu kontrolparaugu jāizmanto dabīgi inficēti audi (kas saglabāti, liofilizējot vai sasaldējot – 16 līdz – 24 °C temperatūrā).

Par negatīvo kontrolparaugu izmantot parauga ekstrakta alikvotu, kas iepriekš uzrādījis negatīvu rezultātu.

Izmantot daudzlodziņu priekšmetstikļus, kuriem vēlams būt 10 lodziņiem ar diametru vismaz 6 mm.

Kontroles materiālu testē tāpat kā paraugu.

4.1. Sagatavot testu priekšmetstikļus, izmantojot vienu no šādām procedūrām:

i) ekstrakti ar relatīvi nelielām cietes nogulsnēm:

Uz pirmā lodziņa ar pipeti pārnest standartdaudzumu (15 μ l atbilst lodziņam ar 6 mm diametru – lielākiem lodziņiem šo daudzumu proporcionāli palielināt) atkārtoti suspendēta kartupeļu ekstrakta koncentrāta šķīdumā 1/100. Pēc tam līdzīgu daudzumu neatšķaidīta ekstrakta koncentrāta (1/1) iepilināt atlikušajos lodziņos rindā. Otro rindu var izmantot kā dublikātu vai otram paraugam, kā parādīts 1. attēlā;

ii) citi ekstrakti:

Sagatavot atkārtoti suspendētā ekstrakta koncentrāta decimālatšķaidījumus (1/10 un 1/100) buferšķīdumā. Lodziņu rindā ar pipeti pārnest standartdaudzumu (15 μ l atbilst lodziņam ar 6 mm diametru – lielākiem lodziņiem šo daudzumu proporcionāli palielināt) tīras ekstrakta suspensijas un katra šķīduma. Otro rindu var izmantot kā dublikātu vai otram paraugam, kā parādīts 2. attēlā.

4.2. Pilienu izžāvēt apkārtējās vides temperatūrā vai sildot 40–45 °C. Baktēriju sūnas nofiksēt uz priekšmetstikļa, karsējot (15 min 60 °C temperatūrā), apdedzinot ar liesmu, izmantojot 95 % etanolu vai saskaņā ar antivielu piegādātāju īpašām instrukcijām.

Nepieciešamības gadījumā fiksētos priekšmetstikļus līdz turpmākai testēšanai var glabāt sasaldētā veidā sausā noslēgtā kamerā iespējami neilgi (ne ilgāk kā 3 mēnešus).

4.3. IF procedūra:

i) saskaņā 4.1. punkta i) apakšpunktu sagatavo testēšanai priekšmetstikļus:











Sagatavot antivielu divkārsus atšķaidījumus IF buferšķīdumā. Pirmajā iedobē jābūt 1/2 titra (T/2), pārējās – 1/4 titra (T/4), 1/2 titra (T/2), pilnam titram (T) un divkārsam titram (2T);

ii) saskaņā 4.1. punkta ii) apakšpunktu sagatavo testēšanai priekšmetstikļus:

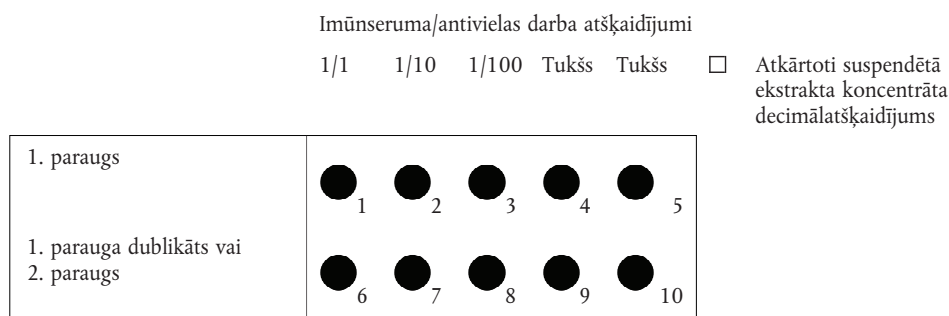
Sagatavot antivielu darba atšķaidījumu (DA) IF buferšķīdumā. Darba atšķaidījums ietekmē specifiskumu.

1. attēls. Testa priekšmetstikļa sagatavošana atbilstoši 4.1. punkta i) apakšpunktam un 4.3. punkta i) apakšpunktam.

		Atkārtoti suspendēta ekstrakta koncentrāta atšķaidījumi						
		1/100	1/1	1/1	1/1	1/1	<input type="checkbox"/>	Atkārtoti suspendētā ekstrakta koncentrāta atšķaidījums
(T = titrs)		T/2	T/4	T/2	T	2T	<input type="checkbox"/>	Divkārsie imūnseruma/antivielas atšķaidījumi

1. paraugs						5
	1	2	3	4		
punkta 1. parauga dublikāts vai 2. paraugs						10
	6	7	8	9		

2. attēls. Testa priekšmetstikliņa sagatavošana atbilstoši 4.1. ii) apakšpunktam un 4.3. punkta ii) apakšpunktam.



4.3.1. Priekšmetstikliņus novietot uz samitrināta papīra. Katru testēšanas lodziņu pilnībā pārklāt ar antivielas atšķaidījumu(-iem). Antiviēlu daudzumam, kas uzpilināts katrā lodziņā, jābūt vismaz vienādam ar ņemtā ekstrakta tilpumu.

Ja nav īpašu norādījumu no antiviēlu piegādātājiem, jāveic šāda procedūra.

4.3.2. Priekšmetstikliņus 30 min inkubē uz samitrināta papīra apsegtā veidā apkārtējās vides temperatūrā (18–25 °C).

4.3.3. Nokrata pilienu no katra priekšmetstikliņa un rūpīgi noskalo ar *IF* buferšķīdumu. Mazgā, uz 5 minūtēm iemērcot *IF-Tween* buferšķīdumā (3. papildinājums) un pēc tam uz 5 minūtēm *IF* buferšķīdumā. Izvairīties no aerosolu vai pilienu pārnesšanas, kas var izraisīt savstarpēju inficēšanos. Uzmanīgi noņemt lieko mitrumu, viegli nosusinot.

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

4.3.5. Priekšmetstikliņus 30 min inkubē uz samitrināta papīra apsegtā veidā apkārtējās vides temperatūrā (18–25 °C).

4.3.6. Nokratīt konjugāta pilienu no priekšmetstikliņa. Noskalot un nomazgāt (sk. 4.3.3.).

Rūpīgi nosusināt lieko šķidrumu.

4.3.7. Ar pipeti katrā lodziņā pārnest 5–10 µl 0,1 M fosfātbufferēta glicerīna (3. papildinājums) vai tirdzniecībā pieejamas saistvielas, kas sekmē krāsas noturīgumu, un uzlikt segstikliņu.

4.4. *IF* testa rezultātu nolasīšana:

4.4.1. Testa priekšmetstikliņus pārbaudīt ar epifluorescences mikroskopu eļļas vai ūdens imersijā 500 līdz 1 000 reīzu palielinājumā, izmantojot filtrus, kas piemēroti darbam ar *FITC*. Lodziņus apskatīt pa diviem diametriem, kas krustojas taisnā leņķī, un pa perimetru. Attiecībā uz paraugiem, kuri uzrāda nelielu daudzumu šūnu, izskatīt vismaz 40 mikroskopa lauciņus.

Vispirms pārbaudīt pozitīvā kontrolparauga priekšmetstikliņu. Šūnām jābūt spilgti fluorescējošām un pilnībā iekrāsotām pie noteiktā antiviēlu titra vai darba šķīduma. *IF* tests jāatkārto (4. sadaļa), ja krāsojumam ir novirze no normālā.

4.4.2. Pārbaudīt, vai priekšmetstikliņu testa lodziņos ir redzamas spilgtas fluorescējošas šūnas ar *C. m. subsp. sepedonicus* raksturīgo morfoloģiju (sk. tīmekļa vietnē <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Fluorescences intensitātei jābūt tādai pašai kā pozitīvajam kontroles celmam tajā pašā antiviēlu atšķaidījumā vai intensīvākai. Šūnas ar nepilnīgu iekrāsojumu vai vāju fluorescenci netiek ņemtas vērā.

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

4.4.3. Pastāv vairākas imunofluorescences testam raksturīgas problēmas. Netipiskas morfoloģijas fluorescento šūnu fona populācijas un nespecifiski reaģējošas saprofitās baktērijas, kuru izmērs un morfoloģija ir līdzīgi *C. m. sepedonicus*, varētu rasties kartupeļu ekstrakta koncentrātā no stolona pamanes gabaliem un kartupeļu lakstu segmentiem.

4.4.4. Jāņem vērā tikai fluorescējošas šūnas ar izmēru un morfoloģiju, kas ir tipiska antivielu titra vai darba atšķaidījuma, kā minēts 4.3. punktā.

4.4.5. *IF* testa nolasījuma interpretācija:

- i) ja ir atrastas spilgti fluorescējošas šūnas ar raksturīgo morfoloģiju, noteikt raksturīgo šūnu vidējo skaitu mikroskopa lauciņā un aprēķināt raksturīgo šūnu skaitu vienā mililitrā atkārtoti suspendēta ekstrakta koncentrāta (4. papildinājums).

IF testa rezultātu uzskata par tiem paraugiem, kuros ir ne mazāk kā 5×10^3 tipisko šūnu uz 1 ml atkārtoti suspendēta ekstrakta koncentrāta. Paraugu uzskata par potenciāli inficētu un ir nepieciešama turpmāka testēšana;

- ii) *IF* testa rezultātu uzskata par negatīvu paraugiem, kuros ir mazāk nekā 5×10^3 tipisko un/vai netipisko šūnu uz 1 ml atkārtoti suspendēta ekstrakta koncentrāta, un paraugu uzskata par negatīvu. Turpmāka testēšana nav jāveic.

5. FISH TESTS

Princips

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

Piezīme:

Izmantot validētās īpašās *C. m.* subsp. *sepedonicus oligozondes* (7. papildinājums). Obligāta ir prasība par to, ka iepriekšējiem testiem pēc šīs metodes jānodrošina reproducējama noteikšana 10^3 – 10^4 *C. m.* subsp. *sepedonicus* šūnas uz 1 ml, kuras pievienotas paraugu ekstraktiem, kas iepriekš uzrādījuši negatīvus rezultātus.

Turpmāk minēto procedūru ieteicams veikt uz tikko sagatavota ekstrakta parauga, bet to var veiksmīgi īstenot, izmantojot ekstrakta paraugus, kas glabāti glicerīna šķīdumā – 16 līdz – 24 °C vai – 68 līdz – 86 °C temperatūrā.

Kā negatīvo kontrolmateriālu izmantot alikvotas no parauga ekstrakta, kas pirms tam uzrādīja negatīvu rezultātu attiecībā uz *C. m.* subsp. *sepedonicus* klātbūtni.

Kā pozitīvos kontrolparaugus sagatavo suspensijas, kas satur 10^5 līdz 10^6 *C. m.* subsp. *sepedonicus* šūnas mililitrā (piemēram, NCPPB 4053 celms vai PD 406 celms) 0,01 M fosfāta buferšķīdumā (FB), izmantojot 3–5 dienu uzsējumu (sagatavošanu sk. 2. papildinājumā). Sagatavot atsevišķus homologu *C. m.* subsp. *sepedonicus* vai citu references celmu pozitīvo kontrolparaugu priekšmetstiklīņus, izmantojot kartupeļu ekstrakta suspensiju, kā minēts 2. papildinājumā.

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

Testēt kontroles materiālu tāpat kā paraugu(-us).

5.1. Kartupeļu ekstrakta fiksēšana

Turpmāk izklāstītā protokola pamatā ir *Wullings et al.* (1998).

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

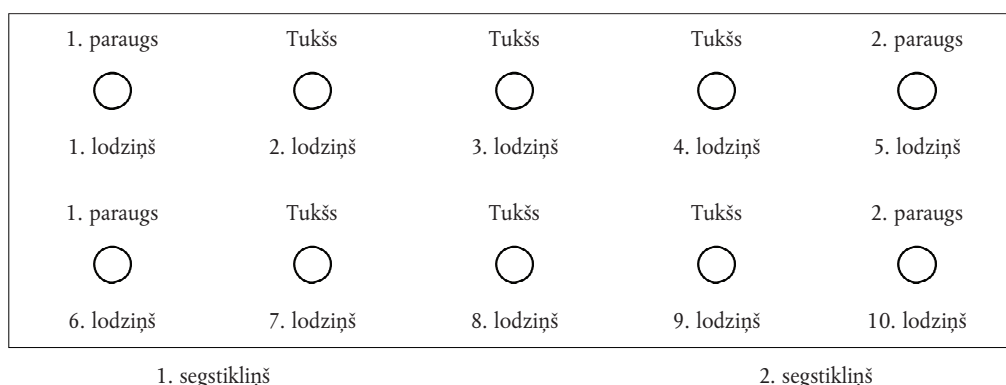
5.1.2. Pārnes 100 µl katra ekstrakta parauga mikromēģenē, un 8 min centrifugē ar 7 000 g.

5.1.3. Atdala virsējo slāni un ekstrakta koncentrātu izšķīdina 500 µl fiksatora, kas sagatavots vismaz 24 stundas pirms tam. Samaisa un 4 °C temperatūrā iztur līdz nākamajai dienai.

Kā alternatīvu fiksatoru var izmantot 96 % etanolu. Lai to izmantotu, izšķīdināt 5.1.2. punktā paredzēto ekstrakta koncentrātu, 50 µl 0,01M FB un 50 µl 96 % etanola. Samaisīt un 4 °C temperatūrā izturēt 30–60 min.

- 5.1.4. Centrifugēt 8 min ar 7 000 g, atdalīt virsējo slāni un atkārtoti suspendēt ekstrakta koncentrātu 75 µl 0,01M FB (sk. 3. papildinājumu).
- 5.1.5. Pārnest 16 µl fiksējošās suspensijas uz tīra daudzkārt izmantojama priekšmetstikliņa, kā parādīts 3. attēlā. Uz katra priekšmetstikliņa uznes 2 dažādus neatšķaidītus paraugus, un 1:100 atšķaidījuma sagatavošanai (0,01M FB), izmanto 10 µl. Atlikušo šķīdumu (49 µl), pievienojot 1 tilp. 96 % etanola, var glabāt – 20 °C temperatūrā. Gadījumā, ja FISH tests jāatkārto, etanolu atdala centrifugējot, un pievieno tādu pašu daudzumu 0,01M FB (samaisot ar vorteksu).

3. attēls. FISH priekšmetstikliņa shēma



- 5.1.6. Ļaut priekšmetstikliņiem nožūt (vai žāvēt eksikatorā 37 °C temperatūrā) un fiksēt ar liesmu.

Šajā posmā procedūru var pārtraukt, un hibridizāciju var turpināt nākamajā dienā. Priekšmetstikliņi jāuzglabā istabas temperatūrā sausā telpā, kurā nav putekļu.

5.2. Hibridizācijas sagatavošana un hibridizācija

- 5.2.1. Sagatavot lizocīma šķīdumu, kas satur 10 mg lizocīma (*Sigma L-6876*) 10 ml buferšķīduma (100 mM Tris-HCl, 59 mM ADTA, pH 8,0). Šo šķīdumu var uzglabāt, bet to drīkst sasaldēt un atkausēt tikai vienu reizi. Katru paraugu pārklāj ar aptuveni 50 µl lizocīma šķīduma un tur 10 min istabas temperatūrā. Tad priekšmetstikliņus vienu reizi iemērc demineralizētā ūdenī un nosusina ar filtrpapīru.

Alternatīvi lizocīma vietā katrā iedobē pārnēs 50 µl 40–400 µg ml⁻¹ K proteīnāzes buferšķīdumā (20 mM Tris-HCl, 2mM CaCl₂, pH 7,4) un 37 °C temperatūrā inkubē 30 min.

- 5.2.2. Šūnas dehidratēt, secīgi uz 1 min iemērcot 50 %, 80 % un 96 % etanolā. Priekšmetstikliņus nožāvē priekšmetstikliņu statīvā.
- 5.2.3. Sagatavot mitro inkubācijas kameru, izklājot hermētiska boksa apakšu ar salveti vai filtrpapīru, kas iemērķts 1x hibridizācijas šķīdumā (7. papildinājums). Sagatavot boksu inkubācijai, vismaz uz 10 min ievietojot hibridizācijai žāvēšanas skapī 55 °C temperatūrā.
- 5.2.4. Sagatavot hibridizācijas šķīdumu (7. papildinājums), katram priekšmetstikliņam paredzot 45 µl, un 5 min turēt 55 °C temperatūrā.
- 5.2.5. Novietot priekšmetstikliņus uz sildvirsmas 45 °C temperatūrā un pievienot pa 10 µl hibridizācijas šķīduma visos 4 iedobumos uz priekšmetstikliņa.
- 5.2.6. Katram priekšmetstikliņam uzlikt 2 segstikliņus (24 x 24 mm), izspiežot gaisu. Hibridizācijai priekšmetstikliņus līdz nākamajai dienai novietot tumsā iepriekš uzsildītā mitruma kamerā 55 °C temperatūrā žāvēšanas skapī.
- 5.2.7. Sagatavot 3 vārglāzes, kurās ir 1 l ultratīra ūdens, 1 litru 1x hibridizācijas maisījuma (334 ml 3x hibridizācijas maisījuma un 666 ml ultratīra ūdens) un 1 l 1/2x hibridizācijas maisījuma (167 ml 3x hibridizācijas maisījuma un 833 ml ultratīra ūdens). Tās sagatavot inkubācijai ūdens vannā 55 °C temperatūrā.
- 5.2.8. No priekšmetstikliņiem noņemt segstikliņus un novietot priekšmetstikliņus statīvā.
- 5.2.9. Noskalot lieko parauga daudzumu, 15 min izturot vārglāzē ar 1x hibridizācijas maisījumu 55 °C temperatūrā.

- 5.2.10. Ievietot priekšmetstikliņu statīvu 1/2 hibridizācijas maisījuma mazgāšanas šķīdumā un inkubēt vēl 15 min.
- 5.2.11. Uz īsu brīdi iemērk priekšmetstikliņus ultratīrā ūdenī un novietot uz filtrpapīra. Nosusināt lieko mitrumu, virsmu uzmanīgi pārsedzot ar filtrpapīru. Katrā lodziņā pievienot 5–10 µl krāsojuma noturīgumu sekmējoša histoloģiskā šķīduma (piemēram, *Vectashield*, *Vecta Laboratories*, Kanāda, ASV vai līdzvērtīga šķīduma) un visu priekšmetstikliņu nosegt ar lielo segstikliņu (24 × 60 mm).

5.3. FISH testa rezultātu nolasišana

- 5.3.1. Ar epifluorescences mikroskopu nekavējoties priekšmetstikliņus imersijas eļļā aplūkot 630 vai 1 000 x palielinājumā. Ar filtru, kas piemērots fluoresceīna izotiocianātam (*FITC*), eubaktēriju šūnas (tostarp izteiktākās gramnegatīvās šūnas) paraugā krāso fluorescējoši zaļā krāsā. Izmantojot tetrametilrodamīna 5-izotiocianāta filtru, *Cy3* iekrāsotās *C. m.* subsp. *sepedonicus* šūnas izskatās fluorescējoši sarkanas. Salīdzināt šūnu morfoloģiju ar pozitīvo kontrolmateriālu morfoloģiju. Šūnām jābūt spilgti luminiscējošām un pilnībā iekrāsotām. *FISH* tests (9.4. sadaļa) jāatkārto, ja krāsojumam ir novirze no normāla. Lodziņus apskatīt pa diviem diametriem, kas krustojas taisnā leņķī, un pa perimetru. Attiecībā uz paraugiem, kuri uzrāda nelielu daudzumu šūnu, aplūkot vismaz 40 mikroskopa lauciņus.
- 5.3.2. Pārbaudīt, vai priekšmetstikliņu testa lodziņos ir redzamas spilgtas fluorescējošas šūnas ar *C. m.* subsp. *sepedonicus* raksturīgo morfoloģiju (sk. tīmekļa vietnē <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Fluorescences intensitātei jābūt tādai pašai kā pozitīvajam kontroles celmam vai intensīvākai. Šūnas ar nepilnīgu iekrāsojumu vai vāju fluorescenci netiek ņemtas vērā.
- 5.3.3. Ja ir aizdomas par inficēšanos, tests jāatkārto. Tas var būt gadījumā, ja visi attiecīgās partijas priekšmetstikliņi uzrāda inficētas šūnas sakarā ar buferšķīduma inficēšanu vai ja inficētas šūnas tiek konstatētas uz segstikliņa (ārpus priekšmetstikliņa lodziņiem).
- 5.3.4. Pastāv vairākas *FISH* testam raksturīgas problēmas. Ekstraktos no kartupeļu stolona pamatnēm un lakstu segmentiem varētu rasties netipiskas morfoloģijas fluorescences šūnu fona populācijas un nespecifiski reaģējošas saprotītās baktērijas, kuru izmērs un morfoloģija ir līdzīgi *C. m.* subsp. *sepedonicus*, taču tas notiek daudz retāk, nekā veicot *IF* testu.
- 5.3.5. Jāņem vērā tikai fluorescējošas šūnas ar tipisku morfoloģiju un raksturīgo izmēru, sk. 5.3.2. punktu.
- 5.3.6. *FISH* testa rezultātu interpretēšana:
- derīgus *FISH* testa rezultātus iegūst, ja visos pozitīvajos kontrolparaugos, izmantojot *FITC* filtru, konstatē koši zaļas fluorescējošas šūnas ar *C. m.* subsp. *sepedonicus* raksturīgo izmēru un morfoloģiju un, izmantojot rodamīna filtru, konstatē sarkanas fluorescējošas šūnas, un tās netiek konstatētas nevienā negatīvajā kontroltestā. Ja ir atrastas spilgti fluorescējošas šūnas ar raksturīgo morfoloģiju, noteikt raksturīgo šūnu vidējo skaitu mikroskopa lauciņā un aprēķināt raksturīgo šūnu skaitu vienā mililitrā atkārtoti suspendēta ekstrakta koncentrāta (4. papildinājums). Paraugus, kuros konstatē ne mazāk kā 5×10^3 tipisko šūnu 1 ml atkārtoti suspendēta ekstrakta koncentrāta, uzskata par potenciāli inficētiem. Nepieciešama turpmāka testēšana. Paraugus, kuros konstatē mazāk nekā 5×10^3 tipisko šūnu 1 ml atkārtoti suspendēta ekstrakta koncentrāta, uzskata par neinficētiem;
 - FISH* testa rezultāts ir negatīvs, ja, izmantojot rodamīna filtru, netiek konstatētas koši sarkanas fluorescējošas šūnas ar *C. m.* subsp. *sepedonicus* raksturīgo izmēru un morfoloģiju, ar nosacījumu, ka raksturīgās koši sarkanās fluorescējošas šūnas konstatē pozitīvajos kontrolparaugos, izmantojot rodamīna filtru.

6. PCR TESTS

Principi

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

Izmantot šo metodi kā galveno skrīninga testu ieteicams tikai gadījumos, kad ir iegūta pieredze tā izmantošanā.

Piezīme:

Iepriekšējiem testiem pēc šīs metodes jānodrošina reproducējama 10^3 līdz 10^4 *C. m. subsp. sepedonicus* šūnu uz 1 ml noteikšana, ja tās pievieno paraugu ekstraktiem, kas iepriekš uzrādījuši negatīvus rezultātus. Var būt nepieciešami optimizācijas eksperimenti, lai visās laboratorijās panāktu maksimālo jutību un specifiskumu.

Izmantot validētus PCR reaģentus un protokolus. Ieteicams izvēlēties metodi ar iekšējo kontroli.

Veikt piemērotus piesardzības pasākumus, lai izvairītos no parauga inficēšanas ar mērķa DNS. PCR testu veic pieredzējuši speciālisti īpaši tam paredzētās molekulārās bioloģijas laboratorijās, lai samazinātu iespējas paraugu inficēt ar mērķa DNS.

Negatīvie kontroltesti (DNS ekstrakcija un PCR) vienmēr jāizmanto kā procedūras galīgais paraugs, lai konstatētu, vai ir notikusi DNS pārnese.

PCR testā jāietver šādi negatīvie paraugi:

- ekstrakta paraugs, kas pirms tam uzrādījis negatīvu rezultātu attiecībā uz *C.m. subsp. Sepedonicus* klātbūtni,
- buferšķīduma paraugi, kas izmantoti baktērijas un DNS ekstrahēšanai no parauga,
- PCR reakcijas maisījums.

Jāiekļauj šādi pozitīvie kontrolparaugi:

- atkārtoti suspendētu ekstraktu alikvotas, kurām pievienota *C. m. subsp. sepedonicus* (sagatavošanu sk. 2. papildinājumā),
- no virulenta izolāta iegūta ūdens suspensija ar 10^6 *C. m. subsp. sepedonicus* šūnām uz 1 ml (piemēram, NCPPB 2140 vai NCPPB 4053),
- ja iespējams, izmantot arī DNS, kas iegūta no pozitīvajiem kontrolparaugiem, veicot PCR testu.

Lai izvairītos no iespējamās inficēšanās, pozitīvo kontrolparaugu sagatavošana telpiski jānodala atsevišķi no testējamajiem paraugiem.

Paraugu ekstrakti iespējami jāattīra no augsnes. Tādēļ gadījumos, kad jāizmanto PCR protokols, ieteicams sagatavot ekstraktus no mazgātiem kartupeļiem.

6.1. DNS attīrīšanas metodes

Izmantot pozitīvos un negatīvos kontrolparaugus saskaņā ar aprakstu iepriekš.

Sagatavot kontroles materiālu tāpat kā paraugu(-us).

Sarežģītu paraugu substrātu gadījumā mērķa DNS attīrīšanai ir pieejamas dažādas metodes, kas ļauj atdalīt PCR inhibitorus, novērst citas fermentatīvas reakcijas un koncentrēt mērķa DNS parauga ekstraktā.

Lietošanai kopā ar validēto PCR metodi, kas aprakstīta 6. papildinājumā, ir optimizēta šāda metode:

6.1.a) Pastrik (2000) metode.

1. Pārnest 220 μ l līzes buferšķīduma (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) 1,5 ml tilpuma mikromēģenē.
2. Pievienot 100 μ l parauga ekstrakta un uz 10 min novietot sildīšanas blokā vai ūdens vannā 95 °C temperatūrā.
3. Mēģeni 5 min turēt ledū.
4. Pievienot 80 μ l lizocīma standartšķīduma (50 mg lizocīma uz 1 ml 10 mM Tris HCl, pH 8,0) un 30 min turēt 37 °C temperatūrā.
5. Pievienot 220 μ l Easy DNA® šķīduma A (Invitrogen), labi samaisīt un 30 min turēt 65 °C temperatūrā.

6. Pievienot 100 µl *Easy DNA*[®] šķīduma B (*Invitrogen*), rūpīgi samaisīt ar vorteksu, līdz paraugs kļūst viendabīgi viskozs.
7. Pievienot 500 µl hloroforma un maisīt, līdz viskozitāte samazinās un maisījums kļūst viendabīgs.
8. Centrifugēt 20 min 4 °C temperatūrā pie 15 000 g, lai atdalītu fāzes un veidotu starpfāzi.
9. Pārnest virsējo fāzi tīrā mikromēģenē.
10. Pievienot 1 ml 100 % etanola (– 20 °C), īsu brīdi maisīt vorteksā un izturēt uz ledu 10 minūtes.
11. Centrifugēt 20 min 4 °C temperatūrā pie 15 000 g un atdalīt etanolu no ekstrakta koncentrāta.
12. Pievienot 500 µl 80 % etanola (– 20 °C) un samaisīt, mēģeni apgriežot otrādi.
13. Centrifugēt 10 min 4 °C temperatūrā pie 15 000 g, saglabāt ekstrakta koncentrātu un atdalīt etanolu.
14. Ļaut ekstraktam izžūt istabas temperatūrā vai DNS vakuumžāvētājā.
15. Atkārtoti suspendēt ekstrakta koncentrātu 100 µl sterila ultratīra ūdens un atstāt istabas temperatūrā vismaz uz 20 min.
16. Līdz izmantošanai PCR glabāt – 20 °C temperatūrā.
17. Centrifugējot atdalīt baltas nogulsnes, ja tādas ir, un PCR izmantot 5 µl virsējā slāņa, kas satur DNS.

6.1.b) Citas metodes

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

6.2. PCR

- 6.2.1. Sagatavot PCR testa un kontroles paraugus saskaņā ar validētu protokolu (6. papildinājums). Sagatavot vienu no parauga iegūta DNS ekstrakta decimālatšķaidījumu (1:10 ultratīrā ūdenī).
- 6.2.2. Saskaņā ar publicēto protokolu (6. papildinājums) sagatavot atbilstošu PCR reakcijas maisījumu vidē, kurā nevar notikt inficēšanās. Validētais PCR protokols ir daudzkārtēja reakcija, kas ietver arī PCR iekšējo kontroli.
- 6.2.3. Pievienot 5 µl DNS ekstrakta uz katriem 25 µl PCR reaģenta sterilās PCR mēģenēs.
- 6.2.4. Sagatavot negatīvā kontroltesta paraugu, kas satur tikai PCR reakcijas maisījumu, un parauga vietā pievienot tās pašas izcelsmes sterilu ūdeni, kas tika izmantots PCR maisījumā.
- 6.2.5. Ievietot mēģenes tajā pašā termokamerā, ko izmantoja iepriekšējās pārbaudēs, un īstenot optimizēto PCR programmu (6. papildinājums).

6.3. PCR produkta analīze

- 6.3.1. Sadalīt PCR amplikonus ar agarozes gela elektroforēzi. To veic ar 5–8 V/cm, ņemot vismaz 12 µl DNS pavairošanas reakcijas maisījuma no katra parauga, kas sajaukts ar 3 µl parauga uznešanas buferšķīduma (6. papildinājums) 2,0 % (m/v) agarozes gela tris-actatāt-EDTA (TAE) buferšķīdumā (6. papildinājums). Izmantot atbilstošu DNS marķieri, piemēram, "100 bp ladder".
- 6.3.2. Lai izceltu DNS joslas, 30–45 min tās krāsot ar etīdija bromīdu (0,5 mg/l), ievērojot atbilstošus piesardzības pasākumus darbam ar šo mutagēno vielu.
- 6.3.3. PCR produktiem, kuru izmērs atbilst paredzētajam (6. papildinājums), izgaismot iekrāsoto gelu ar īsviļņu UV transiluminatoru (piemēram, $\lambda = 302$ nm), un ainu dokumentēt.

- 6.3.4. Visiem no jauna konstatētajiem gadījumiem salīdzināt PCR amplikona autentiskumu, veicot fermentu restrikcijas analīzi atlikušajam DNS pavairošanas paraugam, optimālā temperatūrā optimālu laiku inkubējot ar atbilstošu fermentu un buferšķīdumu (sk. 6. papildinājumu). Identificēt fragmentus, kas sašķelti agarozes gela elektroforēzē pēc iepriekš norādītās metodes, un izgaismot ar UV transluminatoru fragmentu raksturīgo izvietojumu pēc restrikcijas ar fermentu un iekrāsošanas ar etīdija bromīdu. Salīdzināt pozitīvās liecības pirms sašķelšanas un pēc tās.

PCR testa rezultātu interpretācija

PCR testa rezultāts ir negatīvs, ja *C. m. subsp. sepedonicus* raksturīgais paredzamā izmēra PCR amplikons attiecīgajā paraugā netiek konstatēts, bet to konstatē visos pozitīvajos kontroltestos daudzkārtējas PCR gadījumā ar augiem raksturīgiem iekšējās kontroles prameriem: otrais paredzamā izmēra PCR produkts jāpavairo ar attiecīgo paraugu.

PCR testa rezultāts ir pozitīvs, ja tiek konstatēts īpašais *C. m. subsp. sepedonicus* paredzamā izmēra PCR amplikons ar raksturīgo izvietojumu pēc restrikcijas (vajadzības gadījumā), ar nosacījumu, ka tas nav iegūts no kāda no negatīvo kontroltestu paraugiem. Drošu pozitīvā rezultāta apstiprinājumu var iegūt arī, atkārtojot testu ar otru PCR prameru komplektu (9.3. sadaļa).

Piezīme:

Var rasties aizdomas par PCR traucējumiem, ja paredzamais amplikons ir iegūts no pozitīvā kontroltesta parauga, kas satur *C. m. subsp. sepedonicus* ūdenī, bet pozitīvie kontroltesti ar *C. m. subsp. sepedonicus* kartupeļu ekstraktā uzrāda negatīvus rezultātus. Daudzkārtējas PCR protokolos ar iekšējiem PCR kontroltestiem uz reakcijas traucējumiem norāda tas, ka neviens no abiem amplikoniem netiek iegūts.

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

7. BIOPATOGENITĀTES TESTS

Piezīme:

Iepriekšējai orientējošai testēšanai pēc šīs metodes jānodrošina reproducējama noteikšana 10^3 līdz 10^4 *C. m. subsp. sepedonicus* kolonijas veidojošo vienību 1 ml, ja tās pievieno paraugu ekstraktiem, kas iepriekš uzrādījuši negatīvus rezultātus (sagatavošanu sk. 2. papildinājumā).

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

Dažas baklažānu šķirnes ir teicama selektīva barotne *C. m. subsp. sepedonicus* attīstībai pat tad, ja nav simptomu, kā arī nodrošina teicamu saimniekauga apstiprinājuma testu.

Lai samazinātu kļūdaini negatīvu testa rezultātu risku, attīstības apstākļiem jābūt optimāliem.

Audzēšana sīkāk aprakstīta 8. papildinājumā.

- 7.1. Sadalīt atkārtoti suspendētā ekstrakta koncentrāta visu atlikušo testa alikvotu, kā norādīts 3.1.6. vai 3.2.5. punktā baklažānu augiem, izmantojot vienu no turpmāk aprakstītajām metodēm (7.3. vai 7.4.). Izmantot tikai augus 2–3 lapu fāzē līdz brīdim, kad pilnīgi attīstījusies trešā istā lapa. Lai nodrošinātu, ka atkārtoti suspendētais ekstrakta koncentrāts tiek izmantots pilnīgi un turpmāk minētie inokulācijas procesi būtu efektīvi, turpmāk aprakstīto procedūru izpildei nepieciešami paraugi, ko veido 15–25 baklažānu augi.
- 7.2. Baklažānu augus nelaistīt 1 līdz 2 dienas pirms inokulācijas sākuma, lai samazinātu turgora spiedienu.
- 7.3. Inokulācija ar šķēlumu:
- 7.3.1. Pieturot augu ar diviem pirkstiem, uz stublāja, starp dīgļlapām un pirmo lapu ar pipeti ievadīt vienu pilienu suspendēta ekstrakta koncentrātu (apmēram 5 līdz 10 μ l).
- 7.3.2. Ar sterilu skalpeli izdarīt aptuveni 1,0 cm garu un apmēram 2/3 no stublāja diametra dziļu diagonālu griezumumu, griezienu sākot no punkta, kurā ievadīts ekstrakta koncentrāta piliens.
- 7.3.3. Griezumumu cieši noslēgt ar sterilu vazelīnu no šļirces.

- 7.4. Inokulācija ar šļirci:
- Baklažānu stublājus inokulēt uzreiz virs dīgļlapām, izmantojot šļirci ar adatu zemādas injekcijām (ne mazāku par 23G). Sadalīt ekstrakta koncentrātu starp baklažānu augiem.
- 7.5. Pozitīviem kontroltestiem inokulēt 5 augus ar ūdens suspensiju, kuras 1 ml satur 10^5 līdz 10^6 zināmas *C. m. subsp. sepedonicus* kultūras šūnas, un, ja iespējams, ar dabīgi inficētu bumbuļu audiem (sk. 4. sadaļu), izmantojot to pašu inokulācijas metodi (7.3. vai 7.4.).
- 7.6. Negatīviem kontroltestiem 5 augus inokulē ar sterilu ekstrakta koncentrāta šķīdumu, izmantojot to pašu inokulācijas metodi (7.3. vai 7.4.).
- 7.7. Karantīnas apstākļos augus 18–24 °C temperatūrā inkubēt 4 nedēļas. Augi jāinkubē pietiekamā apgaismojumā, piemērotā mitrumā (70–80 %) un jālaista, lai novērstu ūdens izsīkšanu vai auga novīšanu ūdens trūkuma dēļ. *C. m. sepedonicus* šūnas iet bojā temperatūrā, kas pārsniedz 30 °C, bet optimālā attīstības temperatūra ir 21 °C. Lai nepieļautu inficēšanos, pozitīvo kontroltestu un negatīvo kontroltestu paraugus inkubēt uz atsevišķiem siltumnīcas plauktiem vai audzēšanas kamerās, vai, ja nepietiek vietas, stingri nodalīt apstrādes materiālus. Ja augi dažādiem paraugiem jāinkubē cieši blakus, tie jāatdala ar atbilstošiem aizslietņiem. Mēslojot, laistot, pārbaudot un veicot citas darbības, jābūt piesardzīgiem, lai neizraisītu savstarpēju inficēšanos. Ir ļoti svarīgi, lai siltumnīcās nebūtu kaitēkļu, jo tie var pārnest baktērijas no viena auga un citu.
- 7.8. Pēc nedēļas sākt simptomu regulāru pārbaudi. Saskaista, cik augiem ir raksturīgie simptomi. *C. m. subsp. sepedonicus* izraisa baklažānu lapu vīšanu, kas var sākties kā lēnganums lapu malās vai starp lapas dzīslām. Savītušiem audiem sākotnēji var būt tumši zaļa krāsa vai plankumi, bet pirms atmiršanas tie kļūst bālāki. Savītuši audi starp lapas dzīslām bieži izskatās kā taukaini un it kā piepildīti ar ūdeni. Atmirušiem audiem bieži ir spoži dzeltena robežlīnija. Augi var pilnībā neaiziet bojā, jo ilgāks ir periods, kad neparādās slimības pazīmes, jo lielāka ir augu izdzīvošanas iespēja. Augi var izturēt infekciju. Pret mikroorganismiem ieņēmīgi jauni baklažānu augi ir daudz jutīgāki pret mazām *C. m. subsp. sepedonicus* populācijām nekā vecāki augi, tādēļ ir nepieciešams izmantot augus 3. lapas stadijā vai tikko pirms tās.
- Vīšanu var izraisīt arī citu baktēriju vai sēnīšu populācijas, kas var būt bumbuļu audu ekstrakta koncentrātā. Tās var būt *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia carotovora*, subsp. *carotovora* un *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *Erwinia chrysanthemi*, *Phoma exigua* var. *foveata*, kā arī plašas saprofīto baktēriju populācijas. Jo īpaši *Erwinia chrysanthemi* var izraisīt lapu simptomus un vīti, kas ir ļoti līdzīga *C. m. sepedonicus* simptomiem. Vienīgā atšķirība ir stumbra melnēšana *Erwinia chrysanthemi* infekcijas gadījumā. Cita veida vīšanu var atšķirt no *C. m. subsp. sepedonicus* izraisītās vīšanas, tā kā veselās lapas vai pat veselī augi vīst ļoti ātri. Var sagatavot arī krāsojumu pēc Grama – šis tests atšķirs *C. m. subsp. sepedonicus* no *Erwinia* spp.
- 7.9. Tiklīdz baklažānu augiem ir vērojami simptomi, jāveic atkārtota izolācija, izmantojot šo augu savītušos lapu audus un stublāja audus (par audu macerāciju sk. 3.1.3. sadaļu). Dezinficēt baklažānu lapu virsmas un stublājus, notīrot tos ar 70 % etanolu. Veikt baklažānu sulas IF testu vai PCR un izolēt atbilstošā (selektīvā) barotnē (sk. 8. sadaļu). Var sagatavot arī krāsojumu pēc Grama (9. papildinājums). Identificēt iespējamās *C. m. subsp. sepedonicus* tīrkultūras un apstiprināt patogenitāti (sk. 9. un 10. sadaļu).
- 7.10. Noteiktos apstākļos, jo īpaši tad, ja audzēšanas apstākļi nav optimāli, *C. m. subsp. sepedonicus* var saglabāties baklažānu augos kā latentā infekcija pat pēc 4 nedēļu inkubācijas. Ja simptomi netiek novēroti pēc 4 nedēļām, jāveic IF/PCR tests apvienotam paraugam, kas sastāv no 1 cm gariem stublāja posmiem, kuri no katra testa auga ņemti virs inokulācijas vietas. Ja testa rezultāts ir pozitīvs, pēc procedūras, kas minēta 8. pantā, jāveic atkārtota izolācija piemērotā (selektīvā) barotnē. Identificēt iespējamās *C. m. subsp. sepedonicus* tīrkultūras un apstiprināt patogenitāti (sk. 9. un 10. sadaļu).

Biopatogenitātes testa rezultātu interpretēšana

Derīgus biopatogenitātes testa rezultātus iegūst, ja pozitīvā kontroltesta augiem konstatē tipiskus simptomus, no šiem augiem baktērijas var izolēt atkārtoti, un negatīvajos kontroltestos simptomus nekonstatē.

Biopatogenitātes testa rezultāti ir negatīvi, ja testa augi nav inficēti ar *C. m. subsp. sepedonicus*, ar nosacījumu, ka *C. m. subsp. sepedonicus* tiek konstatēta pozitīvajos kontroltestos.

Biopatogenitātes testa rezultāts ir pozitīvs, ja augi ir inficēti ar *C. m. subsp. sepedonicus*.

8. C. M. SUBSP. *SEPEDONICUS* IZOLĒŠANA

Piezīme:

Diagnozi var apstiprināt tikai tad, kad *C. m. subsp. sepedonicus* ir izolēts, pēc tam identificēts (sk. 9. sadaļu) un apstiprināts ar patogenitātes testu (10. sadaļa). Kaut gan *C. m. subsp. sepedonicus* ir izvēlīgs organisms, to var izdalīt no audiem ar inficēšanās pazīmēm.

Tomēr to var nomākt saprofitās baktērijas, kas ātri attīstās, un tāpēc tieša izdalīšana no bumbuļu vai stublāju audu ekstrakta koncentrāta (3.1.6. vai 3.2.5. sadaļa) ir sarežģīta. Ar selektīvu barotni un atbilstošu atkārtoti suspendētu kartupeļu stolona pamatņu vai stublāju ekstrakta koncentrāta šķīdumu ir iespējama tieša *C. m. subsp. sepedonicus* izolēšana.

Izolēšanu veic visiem kartupeļu bumbuļiem vai stublāju segmentiem un baklažāniem, kuriem nav inficēšanās pazīmju, bet attiecībā uz kuriem rezultāts IF/PCR testam, izmantojot apvienoto paraugu (sk. 7.10. sadaļu), bija pozitīvs. Baklažānu augu stublāju macerāciju, ja nepieciešams, veic saskaņā ar aprakstu 3.1.3. sadaļā.

Pozitīviem kontroltestiem izmanto tādas suspensijas decimālatšķaidījumus, kurā ir 10^6 kolonijas veidojošo vienību *C. m. subsp. sepedonicus* mililitrā (piemēram, NCPPB 4053 vai PD 406). Lai izvairītos no iespējamās inficēšanās, pozitīvos kontroltestus pilnībā nodala no paraugiem, kurus paredzēts testēt.

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

Testēt kontroles materiālu tāpat kā paraugu(-us).

8.1. Selektīvie uzņēmumi

8.1.1. Izmantojot 100 µl atkārtoti suspendēta kartupeļu ekstrakta koncentrāta vai baklažānu sulas alikvotu, pagatavot desmitkārtīgu atšķaidījumu ekstrakta koncentrāta bufersķīdumā (3. papildinājums).

8.1.2. Izolēšana no neatšķaidīta kartupeļu ekstrakta koncentrāta parasti neizdodas, jo *Cms* ir ļoti jutīga attiecībā uz augšanas veidu un konkurenci ar saprofitiem. Tā kā baktērijas inficētajos audos parasti tiek konstatētas lielās populācijās, saprofitus var izšķīdināt saglabājot patogēnus. Tāpēc ir ieteicams no katra parauga 100 µl 1/100 līdz 1/10 000 atšķaidījuma pārnest uz MTNA barotnes vai NCP-88 barotnes (5. papildinājums) (izmantojot Petri traukus ar diametru 90 mm, citiem trauku izmēriem attiecīgi pielāgo daudzumu), izmantojot stienīti (stikla stienīti) un ar metodi, kas paredz parauga izlīdzināšanu uz plates.

Piezīme:

Alternatīva iespēja ir 100 µl sākotnējā kartupeļu ekstrakta koncentrāta alikvotu izlīdzināt uz pirmās agara plates ar stienīti, un tad uz stienīša esošo atlikumu noslaucīt gar otro agara plati; visbeidzot to pašu atkārtot gar trešo plati, tādējādi ar stienīti uzējot atšķaidījumu.

8.1.3. Izturēt plates tumsā 21–23 °C temperatūrā.

8.1.4. Sākotnējā plašu pārbaudē, tostarp salīdzinot ar kontroltestu platēm, pēc trīs dienām saskaita *C. m. subsp. sepedonicus* līdzīgās kolonijas, turpmāko skaitīšanu veicot pēc 5, 7 un beidzot pēc 10 dienām.

8.2. Aizdomīgo koloniju attīrīšana

Piezīme:

Uz YGM barotnes jāveic *C. m. subsp. sepedonicus* līdzīgo koloniju uzņēmums nolūkā turpmāk veikt baklažānu augu inokulāciju un/vai identifikāciju; tas jāveic, pirms plates ir pāraugušas, t. i., pēc 3–5 dienām.

8.2.1. Uzstāt *C. m. subsp. sepedonicus* līdzīgās kolonijas uz vienas no šādām barotnēm: (to sastāvs norādīts 5. papildinājumā):

barojošs dekstrozes agars (izmantojams tikai pārsēšanai),

rauga peptona glikozes agars,

barojošs rauga ekstrakta minerālsāļu agars.

Inkubēt 21–24 °C temperatūrā līdz 10 dienām.

C. m. subsp. *sepedonicus* ir lēni augošs organisms, kas parasti 10 dienās veido niecīgi mazas (kā adatas smaile) krēmkrāsas kupolveidīgas kolonijas. *C. m.* subsp. *sepedonicus* raksturīgo koloniju fotoattēli atrodami Komisijas tīmekļa vietnē: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

8.2.2. Pārsēšana tīrkultūru iegūšanai

Augšanas ātrums palielinās pēc pārsēšanas. Tipiskas kolonijas ir krēmbaltā vai ziloņkaula krāsā, dažkārt dzeltenas, noapaļotas, gludas, paaugstinātas, ar izliektu kupolveidīgu formu, glotaini šķidras, ar veselām malām un parasti 1 līdz 3 mm diametrā.

Parastā krāsošana pēc Grama (9. papildinājums) var palīdzēt izvēlēties kolonijas turpmākām pārbaudēm.

8.2.3. Identificēt iespējamās kultūras (sk. 9. sadaļu) un veikt patogenitātes testu (sk. 10. sadaļu).

9. IDENTIFIKĀCIJA

Identificē iespējamās *C. m.* subsp. *sepedonicus* izolātu tīrkultūras, izmantojot vismaz divus no minētajiem testiem, kas balstīti uz dažādiem bioloģiskajiem principiem.

Attiecīgā gadījumā iekļaut zināmus references celmus katram veiktajam testam.

9.1. Audzēšanas barotnēs un fermentatīvās identifikācijas testi

Noteikt turpmāk norādītās fenotipiskās pazīmes, kas pastāvīgi ir vai nav konstatējamas *C. m.* subsp. *sepedonicus* saskaņā ar metodēm Lelliot un Stead (1987), Klement *et al.* (1990), Schaad (2001), anonīms aut. (1987).

Visas barotnes inkubē 21 °C temperatūrā un apskata pēc sešām dienām. Ja augšana nenotiek, tās jāinkubē līdz 20 dienām.

Visos testos jāiekļauj *C. m.* subsp. *sepedonicus* kontroltests. Barības vielu un fermentu identifikācijas testi jāveic attiecībā uz inokulātu no pārtikas agara uzņēmuma. Morfoloģiskie salīdzinājumi jāveic, izmantojot kultūras, kas audzētas uz barojoša dekstrozes agara.

Testi	Sagaidāmais rezultāts
Oksidācijas/fermentācijas (O/F) tests	Inerta vai vāji oksidatīva
Oksidāzes aktivitāte	–
Pieaugums 37 °C temperatūrā	–
Ureāzes izstrāde	–
Eskulīna hidrolīze	+
Cietes hidrolīze	– vai vāji izteikta
Tolerance pret 7 % NaCl	–
Indola tests	–
Katalāzes aktivitāte	+
H ₂ S izstrāde	–
Citrāta patēriņš	–
Želatīna sašķidrināšana	–
Skābe no glicerīna	–
Skābe no laktozes	– vai vāji izteikta
Skābe no ramnozes	–
Skābe no salicīna	–
Krāsojums pēc Grama (9. papildinājums)	+

9.2. IF tests

- a) Sagatavot suspensiju IF bufersķīdumā, kurā ir aptuveni 10^6 šūnas mililitrā (3. papildinājums).
- b) Sagatavot atbilstošās antivielas divkāršu atšķaidījumu sērijas.
- c) Veikt IF procedūru (4. sadaļa).
- d) IF testa rezultāts ir pozitīvs, ja kultūras IF titrs ir vienāds ar pozitīvā kontroltesta titru.

9.3. PCR tests

- a) Sagatavot suspensiju ultratīrā ūdenī, kurā ir aptuveni 10^6 šūnas ml.
- b) 100 μ l šūnu suspensijas slēgtās mēģenēs termokamerā vai verdoša ūdens vannā 4 min karsē 100 °C temperatūrā. Nepieciešamības gadījumā tikko sagatavota NaOH pievienošana 0,05 M galīgajai koncentrācijai var palīdzēt šūnu līzei. Tad paraugus var glabāt – 16 līdz – 24 °C temperatūrā, līdz tie ir nepieciešami.
- c) Veikt atbilstošās PCR procedūras, lai pavairotu *C. m. subsp. sepedonicus* raksturīgos amplikonus (piemēram, Pastrik, 2000; sk. 4. papildinājumu; Li un de Boer, 1995; Mills et al., 1997; Pastrik un Rainey, 1999; Schaad et al., 1999).
- d) *C. m. subsp. sepedonicus* identifikācija ir pozitīva, ja PCR amplikoniem ir tādi paši restrikcijas fragmentu garuma polimorfismi un amplikoni ir vienādi pēc izmēra ar pozitīvā kontroltesta celmu.

9.4. FISH tests

- a) Sagatavot suspensiju ultratīrā ūdenī kurā ir aptuveni 10^6 šūnas ml.
- b) Veikt FISH procedūru (5. sadaļa).
- c) FISH testa rezultāts ir pozitīvs, ja uzsējuma un pozitīvā kontroltesta reakcijas ir vienādas.

9.5. Taukskābju sastāva profilēšanas tests (FAP)

- a) Audzēt kultūru uz triptāzes sojas agara (*Oxoid*) 72 stundas 21 °C temperatūrā (\pm 1 °C).
- b) Izmantot atbilstošu FAP procedūru (*Janse, 1991; Stead, 1992*).
- c) FAP testa rezultāts ir pozitīvs, ja iespējamās kultūras profils ir vienāds ar pozitīvā kontroltesta profilu. Taukskābes 15:1 *Anteiso A*, 15:0 *Iso*, 15:0 *Anteiso*, 16:0 *Iso*, 16:0 un 17:0 *Anteiso* ir raksturīgas *C. m. sepedonicus*. Citām ģintīm piederīgām baktērijām, piemēram, *Curtobacterium*, *Arthrobacter* un *Micrococcus*, arī ir dažas no šīm taukskābēm, bet 15:1 *Anteiso A* ir reta skābe šajās baktērijās; tā ir visās *Clavibacter* spp. robežās no 1 % līdz 5 %. *C. m. sepedonicus* baktērijās šis daudzums parasti ir aptuveni 5 %.

9.6. BOX-PCR

- a) Sagatavot suspensiju ultratīrā ūdenī, kurā ir aptuveni 10^6 šūnas ml.
- b) Veikt testu saskaņā ar procedūru (*Smith et al., 2001*).

10. APSTIPRINĀJUMA TESTS

Patogenitātes tests jāveic, lai galīgi apstiprinātu *C. m. subsp. sepedonicus* diagnozi un apstiprinātu kultūru virulenci, kas identificētas kā *C. m. subsp. sepedonicus*.

- 10.1. No testējamā izolāta 3 dienu uzsējuma sagatavot inokulātu, kurā ir aptuveni 10^6 šūnas ml, un sagatavot pozitīvā kontroltesta *C. m. subsp. sepedonicus* celmu.

- 10.2. Inokulēt 5–10 jaunu baklažānu sēklaudžu stublājus 3 lapu fāzē (7.3. vai 7.4. sadaļa).
- 10.3. Inkubēt 18–24 °C temperatūrā pietiekamā apgaismojumā, augstā relatīvajā mitrumā un laistīt, lai novērstu ūdens izsīkšanu vai auga novīšanu ūdens trūkuma dēļ (7.7. sadaļa). Tirkultūrām raksturīgo vīti novēro 2 nedēļu laikā, taču augus, kuriem nav inficēšanās pazīmju pēc minētā laika (sk. 7.8. sadaļu), turpina audzēt līdz 3 nedēļu perioda sasniegšanai tādā temperatūrā, kas veicina baklažānu augu attīstību, bet nav augstāka par 25 °C (8. papildinājums). Ja pēc 3 nedēļām nav inficēšanās pazīmju, kultūru nevar apstiprināt kā *C. m. subsp. sepedonicus* patogēno formu.
- 10.4. Augiem ar inficēšanās pazīmēm izolēt stumbra daļu, ko izgriez 2 cm virs inokulācijas vietas. Sasmalcināt un suspendēt nelielā daudzumā sterila destilēta ūdens vai 50 mM fosfāta buferšķīduma (3. papildinājums). Izolēt no suspensijas uzklājot vai uzšējot atšķaidījumu uz MTNA vai YPGA (5. papildinājums), 3–5 dienas inkubēt 21–23 °C temperatūrā un novērot *C. m. subsp. sepedonicus* tipisko koloniju veidošanos.

1. papildinājums

Laboratorijas, kas piedalās protokolu optimizācijas un validācijas procesā

Laboratorija (*)	Atrašanās vieta	Valsts
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Vīne un Linca	Austrija
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Beļģija
Plantedirektoratet	Lyngby	Dānija
Central Science Laboratory	Jorka	Anglija
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburga	Skotija
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	Francija
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Francija
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Vācija
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannovere	Vācija
State Laboratory	Dublina	Īrija
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Nīderlande
Norwegian Crop Research Institute, Plant Protection Centre	Aas	Norvēģija
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lisabona	Portugāle
Nacionalni institut za biologijo	Ļubļana	Slovēnija
Centro de Diagnóstico de Aldearrubia	Salamanka	Spānija

(*) Zinātniekus kontaktpersonas sk. tīmekļa vietnē <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

2. papildinājums

Pozitīvo un negatīvo kontroltestu sagatavošana svarīgākajiem skrīninga testiem PCR/IF un FISH

Sagatavot *C. m. subsp. sepedonicus* virulentā celma 72 stundu uzsējumu [NCPBB 4053 vai PD 406] uz MTNA barotnes un suspendēt 10 mM fosfātskāidumā, lai iegūtu šūnu koncentrāciju aptuveni 1 līdz 2×10^8 kolonijas veidojošo vienību 1 ml. Tā parasti ir viegli duļķaina suspensija ar optisko blīvumu 0,20 pie 600 nm.

Atdalīt stolona pamatnes vadaudu gabalus 200 kartupeļu bumbuļiem no šķirnes ar baltu mizu, par kuriem zināms, ka tie ir brīvi no *C. m. subsp. sepedonicus*.

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

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

Pārnest 100 µl *C. m. subsp. sepedonicus* suspensijas pirmajā mikromēģenē. Homogenizēt, izmantojot vorteksu.

Sagatavot decimālatšķaidījumus nākamajās piecās mikromēģenēs.

Sešas inficētās mikromēģenes tiks izmantotas kā pozitīvie kontrolparaugi. Četras neinficētās mikromēģenes tiks izmantotas kā negatīvie kontrolparaugi. Mikromēģenes attiecīgi marķēt.

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

C. m. subsp. sepedonicus klātbūtne un daudzums kontrolparaugos vispirms jāapstiprina ar IF testu.

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

IF un FISH testam veikt pozitīvo un negatīvo kontrolparaugu testēšanu katrā testa paraugu sērijā.

IF, FISH un PCR testiem minimālajai *C. m. subsp. sepedonicus* noteikšanas jutībai pozitīvajā kontrolē ir jābūt 10^6 un 10^4 šūnas/ml, un tās netiek atrastas nevienā negatīvajā kontrolparaugā.

3. papildinājums

Buferšķīdumi testu procedūrām

VISPĀRĪGI: Sterilus buferšķīdumus neatvērtā veidā var glabāt ne ilgāk kā vienu gadu.

1. Ekstrakcijas procedūras buferšķīdumi1.1. *Ekstrakcijas buferšķīdumi (50 mM fosfāta buferšķīdums, pH 7,0)*

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

Na ₂ HPO ₄ (bez ūdens)	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
Destilēts ūdens	1,00 l

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

Papildu komponentus var lietot šādi:

	Mērķis	Daudzums (uz l)
Lubrola pārslas	Deflokulants (*)	0,5 g
DC silikona pretputu līdzeklis	Pretputošanas līdzeklis (*)	1,0 ml
Tetranātrija pirofosfāts	Antioksidants	1,0 g
Polivinilpirolidons-40 000 (PVP - 40)	PCR inhibitoru saistīšanai	50 g

(*) Izmantošanai ar homogenizācijas ekstrakcijas metodi.

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

Šo buferšķīdumu izmanto, lai atkārtoti suspendētu un atšķaidītu ekstraktu no kartupeļu bumbuļu stolona pamatnes gabaliem, kas koncentrēti ar centrifugēšanas metodi.

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

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

2. IF testa buferšķīdumi2.1. *IF buferšķīdums (10 mM fosfātbuferēts nātrija hlorīda fizioloģiskais šķīdums, (PBS) pH 7,2)*

Šo buferšķīdumu izmanto antivielu atšķaidīšanai.

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

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

2.2. *IF-Tween buferšķīdums*

Šo buferšķīdumu izmanto priekšmetstikliņu mazgāšanai.

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

2.3. *Fosfātbuferēts glicerīns, pH 7,6.*

Šo buferšķīdumu izmanto kā histoloģisko šķīdumu, ko uznes *IF* priekšmetstikliņa lodziņiem, lai pastiprinātu fluorescenci.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	3,2 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,15 g
Glicerīns	50 ml
Destilēts ūdens	100 ml

Pret izbalēšanu noturīgi histoloģiskie šķīdumi ir nopērkami gatavi, piemēram, *Vectashield*[®] (*Vector Laboratories*) vai *CitiFluor*[®] (*Leica*).

4. papildinājums

Inficēšanās līmeņa noteikšana ar IF un FISH testu

1. Saskaitīt raksturīgi fluorescējošo šūnu vidējo skaitu vienā laukā (c).
2. Aprēķināt raksturīgi fluorescējošo šūnu skaitu vienā mikroskopa lodziņā (C).

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

kurā S = daudzlodziņu priekšmetstikliņa viena lodziņa virsmas laukums un
 s = objektīva redzes lauka virsmas platība.

$s = \pi^2/4G^2K^2$ kur i = lauka koeficients (atkarībā no okulāra tipa tas var būt robežās no 8-24),
 K = mēģenes koeficients (1 vai 1,25),
 G = objektīva palielinājums (100x, 40x u. c.).

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

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

kur y = atkārtoti suspendēta ekstrakta koncentrāta daudzums katrā lodziņā un
 F = atkārtoti suspendēta ekstrakta koncentrāta atšķaidījuma pakāpe.

5. papildinājums

Barotne C. m. subsp. sepedonicus izolācijai un audzēšanaia) *Vispārējās augšanas barotnes*

Barojošs agars (NA)

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

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

Barojošs dekstrozes agars (NDA)

Difco bacto Barojošs agars, kas satur 1 % D(+) glikozes (monohidrāta). Sterilizēt 20 min autoklāvā 115 °C temperatūrā.

Rauga peptona glikozes agars (YPGA)

Rauga ekstrakts (<i>Difco</i>)	5,0 g
Baktopeptons (<i>Difco</i>)	5,0 g
D(+)-glikoze (monohidrāts)	10,0 g
Baktoagars (<i>Difco</i>)	15,0 g
Destilēts ūdens	1,0 l

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

Rauga ekstrakta minerālāļu barotne (YGM)

<i>Bakto</i> rauga ekstrakts (<i>Difco</i>)	2,0 g
D(+) Glikoze (monohidrāts)	2,5 g
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
Baktoagars (<i>Difco</i>)	18 g
Destilēts ūdens	1,0 l

Izšķīdināt sastāvdaļas un devās pa 0,5 l sterilizēt 20 min autoklāvā 115 °C temperatūrā.

b) *Validētās selektīvās augšanas barotnes*

MTNA barotne

Ja nav norādīts citādi, visi barotnes komponenti ir no *BDH*.

Rauga ekstrakts (<i>Difco</i>)	2,0 g
Mannīts	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
Agars (<i>Oxoid</i> Nr. 1)	16,0 g
Destilēts ūdens	1,0 l

Izšķīdināt sastāvdaļas, līdzsvarot pH līdz 7,2. Pēc sterilizēšanas autoklāvā (15 min 121 °C temperatūrā) un atdzišanas līdz 50 °C pievienot antibiotikas: trimetoprimu 0,06 g, nalidiksīnskābi 0,002 g, amfotericīnu B 0,01 g.

Antibiotiku rezerves šķīdumi: trimetoprimis (*Sigma*) un nalidiksīnskābe (*Sigma*) (abi 5 mg/ml), 96 % metanolā, amfotericīns B (*Sigma*) (1 mg/ml) dimetilsulfoksīdā. Standartšķīdumus sterilizē filtrējot.

Piezīme:

Pamatbarotnes derīguma termiņš ir 3 mēneši. Pēc antibiotiku pievienošanas derīguma termiņš ir 1 mēnesis, ja to uzglabā atdzesētu.

NCP-88 barotne

Barojošs agars (<i>Difco</i>)	23 g
Rauga ekstrakts (<i>Difco</i>)	2 g
D-mannīts	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
Destilēts ūdens	1,0 l

Izšķīdināt sastāvdaļas, noregulēt pH līdz 7,2. Pēc sterilizēšanas autoklāvā un atdzesēšanas līdz 50 °C pievienot šādas antibiotikas: polimiksīna B sulfātu (*Sigma*) 0,003 g, nalidiksīnskābi (*Sigma*) 0,008 g, cikloheksimīdu (*Sigma*) 0,2 g.

Izšķīdināt antibiotikas rezerves šķīdumos šādā veidā: nalidiksīnskābi 0,01 M NaOH, cikloheksimīdu 50 % etanolā, polimiksīna B sulfātu destilētā ūdenī. Rezerves šķīdumus sterilizē filtrējot.

Piezīme:

Pamatbarotnes derīguma termiņš ir 3 mēneši. Pēc antibiotiku pievienošanas derīguma termiņš ir 1 mēnesis, ja to uzglabā atdzesētu.

6. papildinājums

Validēts PCR protokols un reaģenti

Piezīme:

Obligāta ir prasība par to, lai iepriekšējo testu reproducējamā noteikšanas jutība būtu vismaz 10^3 līdz 10^4 *C. m. sepedonicus* šūnas mililitrā parauga ekstrakta.

Tāpat arī iepriekšējie testi nedrīkst uzrādīt nevienu šķietami pozitīvu rezultātu attiecībā uz izvēlēto baktēriju celmiem

1. Multiplās PCR protokols ar iekšējo PCR kontroli (Pastrik, 2000)

1.1. Oligonukleotīdu praimeri

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

Paredzamais amplikona izmērs no *C. m. subsp. sepedonicus* DNS matricas – 502 bp (PSA-Oligonukleotīdu pāris).

Paredzamais amplikona izmērs no 18S rRNA iekšējās PCR kontroles – 377 bp (NS Oligonukleotīdu pāris).

1.2. PCR reakcijas maisījums

Reaģents	Reaģenta daudzums	Galīgā koncentrācija
Sterils ultratīrs ūdens	15,725 µl	
10x PCR buferšķīdums ⁽¹⁾ (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1x (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (V frakcija) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
dNTP maisījums (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Praimers PSA-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Praimers PSA-R (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Praimers NS-7-F (10 µM) ⁽²⁾	0,1 µl	0,04 µM
Praimers NS-8-R (10 µM) ⁽²⁾	0,1 µl	0,04 µM
Taq polimerāze (5 U/µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1,0 U
Parauga tilpums	5,0 µl	
Kopējais tilpums:	25,0 µl	

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

⁽²⁾ NS-7 F un NS-8-R oligonukleotīdu praimera koncentrācija tika optimizēta kartupeļu stolona gabalu ekstrakcijai, izmantojot homogenizācijas metodi un DNS attīrīšanu pēc Pastrik (2000) metodes (sk. 6.1.a) un 6.2. sadaļu). Reaģentu koncentrācijas atkārtota optimizācija ir nepieciešama, ja izmanto ekstrakciju ar kratīšanas metodi vai citu DNS izolācijas metodi.

1.3. PCR reakcijas apstākļi

Veikt šādu programmu:

1 cikls	i)	3 minūtes 95 °C temperatūrā (DNS matricas denaturēšana)
10 cikli	ii)	1 minūti 95 °C temperatūrā (DNS matricas denaturēšana)
	iii)	1 minūti 64 °C temperatūrā (praimeru hibridizācija)
	iv)	1 minūti 72 °C temperatūrā (kopijas sintēze)

25 cikli	v)	30 sekundes 95 °C temperatūrā (DNS matricas denaturēšana)
	vi)	30 sekundes 62 °C temperatūrā (praimeru kušana)
	vii)	1 minūti 72 °C temperatūrā (kopijas sintēze)
1 cikls	viii)	5 minūtes 72 °C temperatūrā (fragmentu galu aizpildīšana)
	ix)	uzglabāt 4 °C temperatūrā

Piezīme:

Šī programma ir optimizēta izmantošanai ar MJ Research PTC 200 termisko ciklu kameru. Izmantojot citiem modeļiem, iespējams, ka jāmaina ii), iii), iv), v), vi) un vii) ciklu ilguma solis.

1.4. Amplikona restriktāzes analīze

No *C. m. subsp. sepedonicus* DNS pavairotie PCR produkti veido atšķirīgu restrikcijas fragmentu garuma polimorfismu ar fermentu Bgl II pēc 30 min ilgas inkubācijas 37 °C temperatūrā. No *C. m. subsp. sepedonicus* iegūto restrikcijas fragmentu raksturīgais izmērs ir 282 bp un 220 bp.

2. Parauga uznešanas buferšķīduma pagatavošana

2.1. Bromfenolzilais (10 % rezerves šķīdums)

Bromfenolzilais	5 g
Bidestilēts ūdens	50 ml

2.2. Parauga uznešanas buferšķīdums

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

3. 10X tris-acetāt-EDTA (TAE) buferšķīdums, pH 8,0

Tris buferšķīdums	48,4 g
Ledus etiķskābe	11,42 ml
EDTA (dinātrija sāls)	3,72 g
Destilēts ūdens	1, 00 l

Pirms lietošanas atšķaidīt 1X.

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

7. papildinājums

Validētie FISH testa reaģenti

1. Oligozondes

Cms raksturīgā zonde CMS-CY3-01: 5'- ttg cgg ggc gca cat ctc tgc acg -3'
 Nespecifisko eubaktēriju zonde EUR-338-FITC: 5'- gct gcc tcc cgt agg agt-3'

2. Fiksējošais šķīdums

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

- i) Līdz aptuveni 60 °C uzsildīt 9 ml molekulāras tīrības klases ūdens (piemēram, ultratīru ūdeni (UPW)) un pievienot 0,4 g paraformaldehīda. Paraformaldehīdu izšķīdina, pievienojot 5 pilienus 1N NaOH un maisot ar magnētisko maisītāju.
- ii) Noregulēt pH līdz 7,0, pievienojot 0,1 M fosfāta buferšķīduma (PB, pH 7,0) un 5 pilienus 1N HCl. Pārbaudīt pH ar indikatorpapīru, ja nepieciešams koriģē, izmantojot HCl vai NaOH.

[UZMANĪBU! NEIZMANTOT PH-METRU ŠĶĪDUMOS, KAS SATUR PARAFORMALDEHĪDU.]

- iii) Filtrēt šķīdumu caur 0,22 µm membrānfiltru un sargāt no putekļiem, turēt 4 °C temperatūrā līdz turpmākai izmantošanai.
- iv) *Piezīme:*
Alternatīvs fiksējošais šķīdums: 96 % etanols.

3. 3X hibridizācijas maisījums

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

Ja nepieciešams, atšķaidīt 1X.

4. Hibridizācijas šķīdums

1X hibridizācijas šķīdums

Nātrija dodecilsulfāts (SDS) 0,01 %
 Zonde EUB 338 5 ng/µl
 Zonde CMSCY301 5 ng/µl

Sagatavot hibridizācijas šķīduma daudzumus saskaņā ar 1. tabulu. Katram priekšmetstikliņam (kas satur 2 dažādus paraugus un to dublikātus) nepieciešami 90 µl hibridizācijas šķīduma.

Tabula. Ieteicamie daudzumi hibridizācijas maisījuma pagatavošanai

	2 priekšmetstikliņi	8 priekšmetstikliņi
Sterils ultratīrs ūdens	50,1	200,4
3x hibridizācijas maisījums	30,0	120,0
1 % SDS	0,9	3,6
Zonde EUB 338 (100 ng/µl)	4,5	18,0
Zonde CMSCY301 (100 ng/µl)	4,5	18,0
Kopējais tilpums (µl)	90,0	360,0

N.B. Šķīdumi, kas satur gaismjutīgas oligozondes, jāglabā tumšā - 20 °C temperatūrā. Sargāt no tiešiem saules stariem vai elektriskā apgaismojuma to izmantošanas laikā.

5. 0,1M fosfāta buferšķīdums, pH 7,0

Na ₂ HPO ₄	8,52 g
KH ₂ PO ₄	5,44 g
Destilēts ūdens	1,00 l

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

8. papildinājums**Baklažānu kultūra**

Iesēt baklažānu (*Solanum melongena*) sēklas pasterizētā sēklaudzēšanas kompostā. Pārstādīt stādus ar pilnībā izplaukušām dīgļlapām (10 līdz 14 dienas) pasterizētā kompostā.

Baklažāna augus audzē siltumnīcā ar šādiem vides apstākļiem:

dienas ilgums		14 stundas vai dabīgs dienas garums, ja ilgāks;
temperatūra	dienā	21 līdz 24 °C;
	naktī	15 °C.

Piemērotās baklažānu augu šķirnes: Black Beauty,
Long Tom,
Rima,
Balsas.

Piegādātāji: sk. tīmekļa vietnē <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

9. papildinājums

Procedūra krāsošanai pēc Grama (Hucker modifikācija) (Doetsch, 1981) ⁽¹⁾*Kristālvioletā šķīdums*

Izšķīdināt 2 g kristālvioletā 20 mililitros 95 % etanola.

Izšķīdināt 0,8 g amonija oksalāta 80 ml destilēta ūdens.

Šos abus šķīdumus sajaukt.

Lugola joda šķīdums

Jods	1 g
Kālija jodīds	2 g
Destilēts ūdens	300 ml

Cietvielu sastāvdaļas sajaukt piestalā ar piestu. Pievienot ūdenī un slēgtā traukā maisīt, lai izšķīstu.

Safranīna šķīdums

Rezerves šķīdums:

Safranīns O	2,5 g
95 % etanols	100 ml

Samaisīt un uzglabāt.

Darba šķīdumu iegūst, atšķaidot 1:10.

Krāsošana

1. Sagatavot uztriepes, ļaut tām izžūt un termiski fiksēt.
2. Priekšmetstikliņu uz vienu minūti pārklāt ar kristālvioletā šķīdumu.
3. Ātri noskalot ūdensvada ūdenī.
4. Uz 1 min pārklāt ar Lugola joda šķīdumu.
5. Skalot ūdensvada ūdenī un nosusināt.
6. Atkrāsot ar 95 % etanolu, pievienojot pa pilieniem līdz nemainīgai krāsai, vai 30 s turot etilspirtā un uzmanīgi maisot.
7. Skalot ūdensvada ūdenī un nosusināt.
8. Uz 10 s pārklāt ar safranīna šķīdumu.
9. Skalot ūdensvada ūdenī un nosusināt.

Grampozitīvo baktēriju reakcija ir violeti zils krāsojums. Gramnegatīvo baktēriju reakcija ir rozīgi sarkans krāsojums.

(¹) Var izmantot arī nopērkamus gatavus šķīdumus un krāsošanas komplektus.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Anonymous, 1987. Scheme of the detection and diagnosis of the ring rot bacterium *Corynebacterium sepedonicum* in batches of potato tubers. Commission of the European Communities, Luxembourg. Publ EUR 11288 EN, 21 pp.
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. and 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. and J. Van Vaerenbergh. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (*Corynebacterium sepedonicum*) in potato. *EPPO Bull.*, No 17, 1987, pp. 1–10.
8. Jansing, H. and 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 pp.
11. Lelliott, R. A., 1966. The plant pathogenic coryneform bacteria. *J. appl. Bact.*, 29, 114–118.
12. Lelliott, R. A., E. Billing and A. C. Hayward, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *J. appl. Bact.*, 29, 470–489.
13. Lelliott, R. A. and 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. and 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. and 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. Pastrok, K.-H. and R.A. Rainey. 1999. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. *J. Phytopathology* 147; 687–693.
17. Pastrok, 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 pp.
19. Schaad, W., Berthier-Schaad, Y., Sechler, A. and 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 pp.
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. and V. G. Collins, 1974. A study in test reproductibility 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. and 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 PIELIKUMS

1. Visos iespējamās organisma klātbūtnes gadījumos, kas identificēti ar I pielikumā aprakstītajām skrīninga testu metodēm, līdz iegūto rezultātu galīgai apstiprināšanai vai noraidīšanai jākonservē un attiecīgi jāsaglabā:

- visi paraugiem ņemtie bumbuļi un, ja iespējams, visi augi, no kuriem ņemti paraugi,
- visi ekstraktu atlikumi un skrīninga testiem papildus sagatavotie materiāli, piemēram, imunofluorescences priekšmetstikliņi,

un

- visa attiecīgā dokumentācija

līdz minēto procedūru pabeigšanai.

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

2. Ja ir pozitīvi apstiprināta šā organisma klātbūtne, jākonservē un attiecīgi jāsaglabā:

- 1. punktā minētie materiāli,

un

- inficētā baklažānu materiāla paraugs, kas inokulēts ar bumbuļu vai augu ekstraktu,

un

- no organisma izolētā kultūra,

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

—

III PIELIKUMS

1. Lai noteiktu iespējamās inficēšanās apjomu saskaņā ar 5. panta 1. punkta b) apakšpunktu, ņem vērā šādus faktorus:
 - bumbuļus vai augus, kas audzēti tādā ražošanas vietā, kas noteikta kā inficēta saskaņā ar 5. panta 1. punkta a) apakšpunktu,
 - ražošanas vietu(-as), kas kāda ražošanas procesa sakarā saistītas ar bumbuļiem vai augiem, kuri noteikti kā inficēti saskaņā ar 5. panta 1. punkta a) apakšpunktu, tostarp tās, kurās kopīgi izmanto ražošanas aprīkojumu un iekārtas tieši, vai ar kopīga apakšuzņēmēja starpniecību,
 - bumbuļus vai augus, kas ražoti iepriekšējā ievilkumā minētajā(-ās) ražošanas vietā(-ās) vai kas atradās šādā(-ās) ražošanas vietā(-ās) tajā laika posmā, kad tie bumbuļi vai augi, kuri noteikti kā inficēti saskaņā ar 5. panta 1. punkta a) apakšpunktu, atradās pirmajā ievilkumā minētajā ražošanas vietā,
 - zemesgabali un telpas, kurās veic darbības ar kartupeļiem no iepriekšējos ievilkumos minētajām ražošanas vietām,
 - jebkuras iekārtas, transportlīdzekļus, traukus, glabātavas vai to vienības un jebkurus citus priekšmetus, tostarp arī iepakojuma materiālu, kas varēja nonākt saskarē ar bumbuļiem vai augiem, kuri noteikti kā inficēti saskaņā ar 5. panta 1. punkta a) apakšpunktu,
 - visus bumbuļus vai augus, kas glabājušies vai bijuši saskarē ar jebkurām iepriekšējā ievilkumā minētajām telpām vai priekšmetiem pirms šādu telpu un priekšmetu tīrīšanas un dezinfekcijas,
 - saskaņā ar 6. pantu veiktās testēšanas rezultātā tos bumbuļus vai augus, kuriem ir vertikāla vai horizontāla klonu radniecība ar tiem bumbuļiem un augiem, kas ir noteikti kā inficēti saskaņā ar 5. panta 1. punkta a) apakšpunktu, un attiecībā uz kuriem, lai gan veikta attiecīgā organisma testa rezultāts bijis negatīvs, ir iespējama inficēšanās klonu radniecības rezultātā, lai pārbaudītu inficēto un klonu radniecībā saistīto bumbuļu un augu identitāti, var veikt papildu testus,

un

 - iepriekšējā ievilkumā minēto bumbuļu un augu audzēšanas vieta(-as).
2. Lai noteiktu iespējamās infekcijas izplatīšanās apjomu saskaņā ar 5. panta 1. punkta c) apakšpunktu, ņem vērā šādus faktorus:
 - attālumu līdz citām ražošanas vietām, kurās audzē kartupeļus vai citus saimniekaugus,
 - kopēju sēklas kartupeļu krājumu audzēšanu un izmantošanu.
3. Saskaņā ar 5. panta 2. punktu paredzētais paziņojums jāsniedz šādi:
 - nekavējoties pēc tam, kas organisma klātbūtne ir apstiprinājusies laboratorijas testu rezultātā, izmantojot metodes, kas minētas I pielikumā; tajā obligāti jānorāda:
 - kartupeļu partijas šķirnes nosaukums,
 - kartupeļu veids (pārtikas, sēklas, u. c.) un, ja nepieciešams, sēklas kartupeļu kategorija,
 - ja pastāv inficēšanās risks attiecībā uz kartupeļiem, ko ievēd no citas dalībvalsts vai dalībvalstīm, izved uz citu dalībvalsti vai dalībvalstīm, tā dalībvalsts, kurā ir apstiprināts konkrētais gadījums, nekavējoties sniedz attiecīgajai dalībvalstij vai dalībvalstīm šādu informāciju, kas vajadzīga, lai izpildītu 5. panta 3. punkta prasības, t. i.:
 - kartupeļu partijas šķirnes nosaukums,
 - nosūtītāja un saņēmēja vārds/nosaukums un adrese,
 - kartupeļu partijas piegādes datums,

- piegādātās kartupeļu partijas lielums,
- vajadzības gadījumā jāpievieno augu pases kopija vai vismaz augu pases numurs, ja tas nepieciešams, vai ražotāja vai tirgotāja reģistrācijas numurs, ja tas nepieciešams, un piegādes apliecības kopija.

Komisijai nekavējoties paziņo par šādas informācijas sniegšanu tad:

- kad ir pabeigti visi izmeklējumi, un attiecībā uz katru gadījumu norāda:
 - inficēšanās apstiprināšanas datumu,
 - īsu aprakstu izmeklēšanai, kas veikta, lai identificētu inficēšanas avotu un iespējamo infekcijas izplatīšanos, norādot arī to, kādā apmērā veikta paraugu ņemšana,
 - informāciju par identificētajiem vai iespējamiem inficēšanās avotiem,
 - noteiktās inficēšanās sīku aprakstu, tostarp ražošanas vietu skaitu un kartupeļu partiju skaitu ar šķirnes norādi, un sēklas kartupeļiem to kategoriju,
 - norobežotās zonas sīku aprakstu, tostarp to ražošanas vietu skaitu, kuras nav atzītas par inficētām, bet ir iekļautas attiecīgajā zonā,
 - pārējo informāciju par apstiprināto infekcijas uzliesmojumu, ko varētu pieprasīt Komisija.

IV PIELIKUMS

1. 7. panta 1. punktā paredzētie oficiāli kontrolētie pasākumi ir šādi:

- izmantošana lopbarībā pēc termiskās apstrādes tā, lai novērstu risku, ka organisms varētu izdzīvot,

vai
- iznīcināšana oficiāli apstiprinātā īpašā atkritumu iznīcināšanas vietā, kur nepastāv nosakāms risks patogēna nokļūšanai vidē, piemēram, iesūcoties lauksaimniecības zemē,

vai
- sadedzināšana,

vai
- rūpnieciskās pārstrādes izmantošana, tieši un tūlīt tos piegādājot pārstrādes rūpnīcā ar atbilstošām atkritumu iznīcināšanas iekārtām, attiecībā uz ko ir noteikts, ka nav konkrēti nosakāms šā organisma izplatīšanās risks, un vismaz ar izbraucošo transporta līdzekļu tīrīšanas un dezinfekcijas sistēmu,

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

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

2. Kartupeļu bumbuļiem vai lakstiem, kuri noteikti par iespējami inficētiem saskaņā ar 5. panta 1. punkta b) apakšpunktu, ir piemērotas šē turpmāk norādītās izmantošanas vai iznīcināšanas iespējas, kas minētas 7. panta 2. punktā un kas ir jāīsteno attiecīgo dalībvalstu atbildīgo valsts struktūru kontrolē, atbildīgajām valsts struktūrām savā starpā atbilstīgi sazinoties, lai visos gadījumos nodrošinātu kontroli un iegūtu tās dalībvalsts valsts struktūras apstiprinājumu, kurā kartupeļus paredzēts iesaiņot vai pārstrādāt, atsaucoties uz pirmajā un otrajā ievilkumā minētajām atkritumu iznīcināšanas iekārtām:

- patēriņam paredzēti preču kartupeļi, kas iepakoti tiešai piegādei un izmantošanai bez atkārtotas fasēšanas vietās, kurās ir atbilstošas atkritumu iznīcināšanas iekārtas. Stādīšanai paredzētos kartupeļus drīkst apstrādāt tikai tad tajā pašā vietā, ja to veic atsevišķi vai pēc tīrīšanas un dezinfekcijas,

vai
- rūpnieciskai pārstrādei paredzēti preču kartupeļi, kas iesaiņoti tiešai un tūlītējai piegādei uz pārstrādes rūpniecību ar atbilstošām atkritumu iznīcināšanas iekārtām un vismaz ar izbraucošo transporta līdzekļu tīrīšanas un dezinfekcijas sistēmu,

vai
- cita veida izmantošana vai iznīcināšana, ja tiek konstatēts, ka tas nerada konkrēti nosakāmu organisma izplatīšanās risku, un ja to apstiprinājušas minētās atbildīgās valsts iestādes.

3. Piemērotas objektu tīrīšanas un dezinfekcijas metodes, kas minētas 7. panta 3. punktā, ir tās metodes, attiecībā uz kurām ir apstiprināts, ka nepastāv konkrēti nosakāms organisma izplatīšanās risks, un tās piemēro dalībvalstu atbildīgo valsts iestāžu uzraudzībā.

4. Saskaņā ar 7. panta 4. punktu paredzēto pasākumu kopums, kas dalībvalstīm jāīsteno norobežotajā teritorijā, kas izveidota saskaņā ar 5. panta 1. punkta c) apakšpunktu, ir šāds:

4.1. Ražošanas vietās, kas noteiktas kā inficētas saskaņā ar 5. panta 1. punkta a) apakšpunktu:

- a) laukā, kas noteikts kā inficēts saskaņā ar 5. panta 1. punkta a) apakšpunktu, īsteno vienu no šādiem pasākumiem:

- i) — vismaz trīs audzēšanas gadu laikā pēc noteiktās inficēšanās gada:

- īsteno pasākumus, lai likvidētu pārziemojošos kartupeļu augus un citus šā organisma dabīgas izplatības saimniekaugus,

un

- nestāda kartupeļu bumbuļus, augus vai īstās sēklas, vai citus šā organisma dabīgas izplatības saimniekaugus vai kultūras, attiecībā uz ko pastāv nosakāms šā organisma izplatīšanās risks,

- pirmajā kartupeļu ražas gadā pēc iepriekšējā ievilkumā noteiktā laika perioda ar nosacījumu, ka oficiālo pārbaudi laikā vismaz divus secīgus audzēšanas gadus pirms stādīšanas minētais tīrums ir brīvs no pārziemojošiem kartupeļu augiem un citiem dabīgas izplatības saimniekaugiem, audzē tikai pārtikai paredzētus kartupeļus un izaudzētos bumbuļus pārbauda saskaņā ar I pielikumā aprakstīto procedūru,

- kartupeļu audzēšanas gadus, kas seko aiz iepriekšējā ievilkumā minētā gada un pēc atbilstošas augmaiņas, kas sēklas kartupeļiem ir vismaz divi gadi, stāda sēklas vai pārtikas kartupeļus, veicot oficiālu apsekojumu, kā noteikts 2. panta 1. punktā; vai

- ii) — četru audzēšanas gadu laikā pēc gada, kad noteikta inficēšanās:

- īsteno pasākumus, lai likvidētu pārziemojošo kartupeļu augus un citus šā organisma dabīgas izplatības saimniekaugus,

un

- šo lauku atstāj papuvē vai ierīko ganības, ko bieži un zemu plauj vai intensīvi nogana,

- pirmajā kartupeļu ražas gadā pēc iepriekšējā ievilkumā precizētā perioda, ar nosacījumu, ka oficiālo pārbaudi laikā vismaz divus secīgus audzēšanas gadus pirms stādīšanas minētais tīrums ir brīvs no pārziemojošo kartupeļu augiem un citiem organisma dabīgas izplatības saimniekaugiem, audzē pārtikas vai sēklas kartupeļus, un izaudzētos bumbuļus pārbauda saskaņā ar I pielikumā noteikto procedūru;

- b) citos laukos, kas atrodas inficētajā ražošanas vietā, ar nosacījumu, ka atbildīgās valsts iestādes ir pārliecinājušās par to, ka ir novērsts pārziemojošo kartupeļu augu, kā arī citu organisma saimniekaugu izplatīšanās risks:

- pēc apstiprinātās inficēšanās gada nākamajā audzēšanas gadā nestāda kartupeļu bumbuļus, augus vai īstās sēklas, vai citus šā organisma dabīgas izplatības saimniekaugus, vai

- stāda oficiāli sertificētus sēklas kartupeļus tikai pārtikas kartupeļu ražošanai,

- otrajā audzēšanas gadā, kas seko pēc apstiprinātās inficēšanās gada, stāda tikai sertificētus sēklas vai sēklas kartupeļus, kuri oficiāli testēti attiecībā uz gredzenpūvi un audzēti ražošanas vietās, kuras tiek oficiāli kontrolētas, izņemot 4.1. punktā minētās ražošanas vietas, izmantošanai pārtikā vai kā sēklas kartupeļus,

- vismaz trešajā kartupeļu audzēšanas gadā, kas seko pēc apstiprinātās inficēšanās gada, stāda tikai sertificētus sēklas kartupeļus vai sēklas kartupeļus, kas izaudzēti no sertificētiem sēklas kartupeļiem, veicot oficiālu uzraudzību, izmantošanai pārtikā vai kā sēklas kartupeļus,

- katrā no iepriekšējos ievilkumos minētajiem audzēšanas gadiem veic pasākumus, lai likvidētu pārziemojušos kartupeļu augus un citus šā organisma dabīgas izplatības saimniekaugus, ja tādi ir, un katrā kartupeļu laukā veic novākto kartupeļu oficiālo pārbaudi saskaņā ar I pielikumā aprakstīto procedūru;
- c) tūlīt pēc inficēšanās noteikšanas saskaņā ar 5. panta 1. punkta a) apakšpunktu un pēc pirmā tai sekojošā audzēšanas gada ražošanas vietā visas iekārtas, mehānismus un glabātavas, ko izmanto kartupeļu ražošanā, atbilstoši tīra un dezinficē, izmantojot attiecīgas metodes, kā noteikts 3. punktā;
- d) kultūras ražošanas segto platību vienībā, ja iespējams, pilnīgi nomainīt audzēšanas substrātu:
 - nestāda kartupeļu bumbuļus, augus vai īstās sēklas, izņemot, ja minētajai vienībai ir veikti oficiāli uzraudzības pasākumi, lai likvidētu organismu un iznīcinātu visu saimniekaugu materiālu, tostarp pilnībā nomainot audzēšanas substrātu un veicot šīs ražošanas vienības un visu iekārtu tīrīšanu un dezinfekciju, ja pēc šādu pasākumu veikšanas atbildīgās valsts iestādes ir atļāvušas audzēt kartupeļus,
 - un
 - kartupeļu audzēšanai izmanto sertificētas sēklas kartupeļus, sīkbumbuļus vai meristēmaugus, kas iegūti no pārbaudītiem avotiem.

4.2. Neskarot 4.1. punktā paredzētos pasākumus, dalībvalstis norobežotajā teritorijā veic šādus pasākumus:

- a) tūlīt pēc apstiprinātas inficēšanās tīra un dezinficē visas kartupeļu audzēšanā izmantojamo tehniku, glabātuves, un to iekārtas, vajadzības gadījumā izmantojot atbilstošas metodes, kas izklāstītas 3. punktā;
- b) tūlīt pēc paziņojuma par inficēšanos un vismaz trīs audzēšanas gadus pēc minētā paziņojuma:
 - ar savu atbildīgo valsts iestāžu palīdzību nodrošina kartupeļu bumbuļu audzēšanas, glabāšanas vai apstrādes vietu uzraudzību, kā arī tādu vietu uzraudzību, kurās notiek kartupeļu ražošanas iekārtu kopīga izmantošana saskaņā ar līgumu,
 - pieprasa stādīt tikai sertificētu sēklas materiālu vai sēklu, kas iegūta oficiālā visu attiecīgās teritorijas kartupeļu stādījumu uzraudzībā, un veikt testēšanu pēc tādu sēklas kartupeļu stādījumu novākšanas, kas izaudzēti audzēšanas vietās, kuras saskaņā ar 5. panta 1. punkta b) apakšpunktu atzītas par iespējami inficētām,
 - pieprasa, lai novāktie sēklas kartupeļi un pārtikas kartupeļi visās vietās šajā teritorijā tikti novākti un apstrādāti atsevišķi, vai pieprasa starp šādām darbībām veikt atbilstošas tīrīšanas un dezinfekcijas procedūras,
 - veic oficiālu apsekojumu, kas aprakstīts 2. panta 1. punktā;
- c) izveido programmu, lai vajadzības gadījumā noteiktā laika periodā nomainītu visus sēklas kartupeļu krājumus.

V PIELIKUMS

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

- i) kartupeļu atkritumus (tostarp izbrāķētos kartupeļus un to mizas) un visus cietos atkritumus, kas saistīti ar kartupeļiem (tostarp augsni, akmeņus u. c.), iznīcina,
- atkritumus pārstrādājot oficiāli apstiprinātā īpašā atkritumu iznīcināšanas vietā, kur nav nosakāma riska, ka šis organisms varētu iekļūt vidē, piemēram, iesūcoties lauksaimniecības zemē. Atkritumus nogādā tieši uz iznīcināšanas vietu, ievērojot aizsargpasākumus, lai atkritumi neizbirtu,
- vai
- sadedzinot,
- vai
- veicot citus pasākumus, ja ir konstatēts, ka tie nerada nosakāmu organisma izplatīšanās risku; par šiem pasākumiem paziņo Komisijai un pārējām dalībvalstīm;
- ii) šķidrie atkritumi: pirms novadīšanas notekūdeņus, kuru sastāvā ir suspendētas cietās daļiņas, tās atdala ar filtrēšanu vai nostādināšanu. Cietās daļiņas iznīcina atbilstoši i) apakšpunkta noteikumiem.

Tad šķidros atkritumus:

- pirms to iznīcināšanas uzkaršē līdz vismaz 60 °C, uzturot šo temperatūru vismaz 30 minūtes,
- vai
- iznīcina citādi, saņemot oficiālu apstiprinājumu un oficiālā uzraudzībā, lai novērstu risku, ka notekūdeņi var nonākt saskarē ar lauksaimniecības zemi. Par šiem pasākumiem paziņo pārējām dalībvalstīm un Komisijai.

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