

Uradni list

Evropske unije

L 182

Slovenska izdaja

Zakonodaja

Zvezek 49

4. julij 2006

Vsebina	I	<i>Akti, katerih objava je obvezna</i>	
	★	Direktiva Komisije 2006/56/ES z dne 12. junija 2006 o spremembi prilog k Direktivi Sveta 93/85/EGS o obvladovanju krompirjeve obročkaste gnilobe	1

I

(Akti, katerih objava je obvezna)

DIREKTIVA KOMISIJE 2006/56/ES**z dne 12. junija 2006****o spremembi priloge k Direktivi Sveta 93/85/EGS o obvladovanju krompirjeve obročkaste gnilobe**

KOMISIJA EVROPSKIH SKUPNOSTI JE –

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske skupnosti,

ob upoštevanju Direktive Sveta 93/85/EGS z dne 4. oktobra 1993 ⁽¹⁾ o obvladovanju krompirjeve obročkaste gnilobe in zlasti člena 12 Direktive,

ob upoštevanju naslednjega:

(1) Eden izmed pomembnih škodljivih organizmov za krompir bakterija *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis *et al.* ssp. *sepedonicus* (Spieckermann *et* Kotthoff) Davis *et al.*, povzročiteljica krompirjeve obročkaste gnilobe (v nadaljnem besedilu „organizem“).

(2) Organizem se še vedno pojavlja ponekod v Skupnosti.

(3) Direktiva Sveta 93/85/EGS je določila podrobne ukrepe, ki jih morajo države članice sprejeti proti temu organizmu, da se določi kraj in obseg njegove razširjenosti, preprečijo njegovo pojavljanje in širjenje; in če se odkrije, prepreči njegovo širjenje in da se obvladuje z namenom izkoreninjenja.

(4) Od takrat je prišlo do bistvenega napredka pri razumevanju biologije ter postopkih odkrivanja in identifikacije organizma; poleg tega praktične izkušnje, pridobljene pri obvladovanju organizma, zahtevajo ponovni pregled nekaterih tehničnih določb, ki se nanašajo na ukrepe za obvladovanje.

(5) Kot rezultat tega razvoja, je treba ponovno preveriti in posodobiti ukrepe, vključene v priloge k Direktivi 93/85/EGS.

(6) Glede postopkov odkrivanja in identifikacije so vključeni tudi nedavno razviti postopki, kot sta fluorescentna *in-situ* hibridizacija (FISH) in verižna reakcija s polimerazo (PCR), prav tako pa tudi izboljšave različnih tehničnih elementov trenutnih postopkov odkrivanja in identifikacije.

(7) Izboljšane določbe glede tehničnih elementov ukrepov za obvladovanje so uvedene v zvezi z: načinom konzerviranja testiranih vzorcev za zagotavljanje izsleditve organizma, elementov za ugotavljanje obsega verjetne okužbe, podrobnostmi v zvezi z obveščanjem o potrjeni navzočnosti organizma in ustreznem okuženem območju, izvedbenimi ukrepi na mestih pridelave, ki so bila določena za okužena in v razmejenih območjih.

(8) Ukrepi, predvideni s to direktivo, so v skladu z mnenjem Stalnega odbora za zdravstveno varstvo rastlin –

SPREJELA NASLEDNJO DIREKTIVO:

Člen 1

Priloge k Direktivi 93/85/EGS se nadomestijo z ustreznim besedilom Priloge k tej direktivi.

Člen 2

1. Države članice sprejmejo in objavijo zakone in druge predpise, potrebne za uskladitev s to direktivo, najpozneje do 31. marca 2007.

Komisiji takoj sporočijo besedilo navedenih določb in primerjalno tabelo med navedenimi določbami in Direktivo. Te predpise uporabljajo od 1. aprila 2007.

Države članice se v sprejetih predpisih sklicujejo na to direktivo ali pa sklic nanjo navedejo ob njihovi uradni objavi. Način sklicovanja določijo države članice.

⁽¹⁾ UL L 259, 18.10.1993, str. 2.

2. Države članice Komisiji takoj predložijo besedila temeljnih predpisov nacionalne zakonodaje, sprejetih na področju, ki ga ureja ta direktiva.

Člen 4

Ta direktiva je naslovljena na države članice.

Člen 3

V Bruslju, 12. junija 2006

Ta direktiva začne veljati tretji dan po objavi v *Uradnem listu Evropske unije*.

Za Komisijo
Markos KYPRIANOU
Član Komisije

PRILOGA I

TESTNA SHEMA ZA DIAGNOSTICIRANJE, ODKRIVANJE IN IDENTIFIKACIJO BAKTERIJE KROMPIRJEVE OBROČKASTE GNILOBE, *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* (Smith) Davis *et al.* ssp. *SEPEDONICUS* (Spieckermann *et al.*) Davis *et al.***PODROČJE UPORABE TESTNE SHEME**

Ta shema opisuje različne postopke za:

- (i) Diagnosticiranje krompirjeve obročkaste gnilobe v gomoljih in rastlinah krompirja;
- (ii) Odkrivanje bakterije *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* v vzorcih gomoljev in rastlin krompirjeva;
- (iii) Identifikacija *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*C. m.* subsp. *sepedonicus*).

SPLOŠNA NAČELA

V dodatkih so določeni optimizirani protokoli različnih metod, potrjenih reagentov in podrobnosti za pripravo testnih in kontrolnih materialov. V Dodatku 1 je naveden seznam laboratorijev, ki so vključeni v optimizacijo in potrjevanje protokolov.

Ker protokoli vključujejo odkrivanje karantenskega organizma in bodo vključevali uporabo kultur *C. m.* subsp. *sepedonicus* kot kontrolnih materialov, ki so sposobne preživeti, bo treba postopke opravljati v primernih karantenskih pogojih z ustreznimi napravami za odstranjevanje odpadkov in na podlagi ustreznih dovoljenj, ki jih izdajo uradni organi za rastlinsko karanteno.

Parametri testiranja morajo zagotoviti dosledno in ponovljivo odkrivanje stopenj *C. m.* subsp. *sepedonicus* na določenih pragovih izbranih metod.

Nujna je natančna priprava pozitivnih kontrol.

Za testiranje po zahtevanih pragih so potrebne pravilne nastavitve, vzdrževanje in umerjanje opreme, previdnost pri ravnanju z reagenti in njihovo ohranjanje ter vsi ukrepi za preprečevanje okužbe med vzorci, npr. ločitev pozitivnih kontrol od testnih vzorcev. Uporabljati se morajo standardi obvladovanja kakovosti, da bi se lahko izognili upravnim in drugim napakam, zlasti pri označevanju in dokumentaciji.

Domnevi pojav, kot je določeno v členu 4(2) Direktive 93/85/EGS, pomeni pozitiven rezultat pri diagnostičnih ali presejalnih testih, ki se opravijo na vzorcu, kot je določeno v puščičnih diagramih.

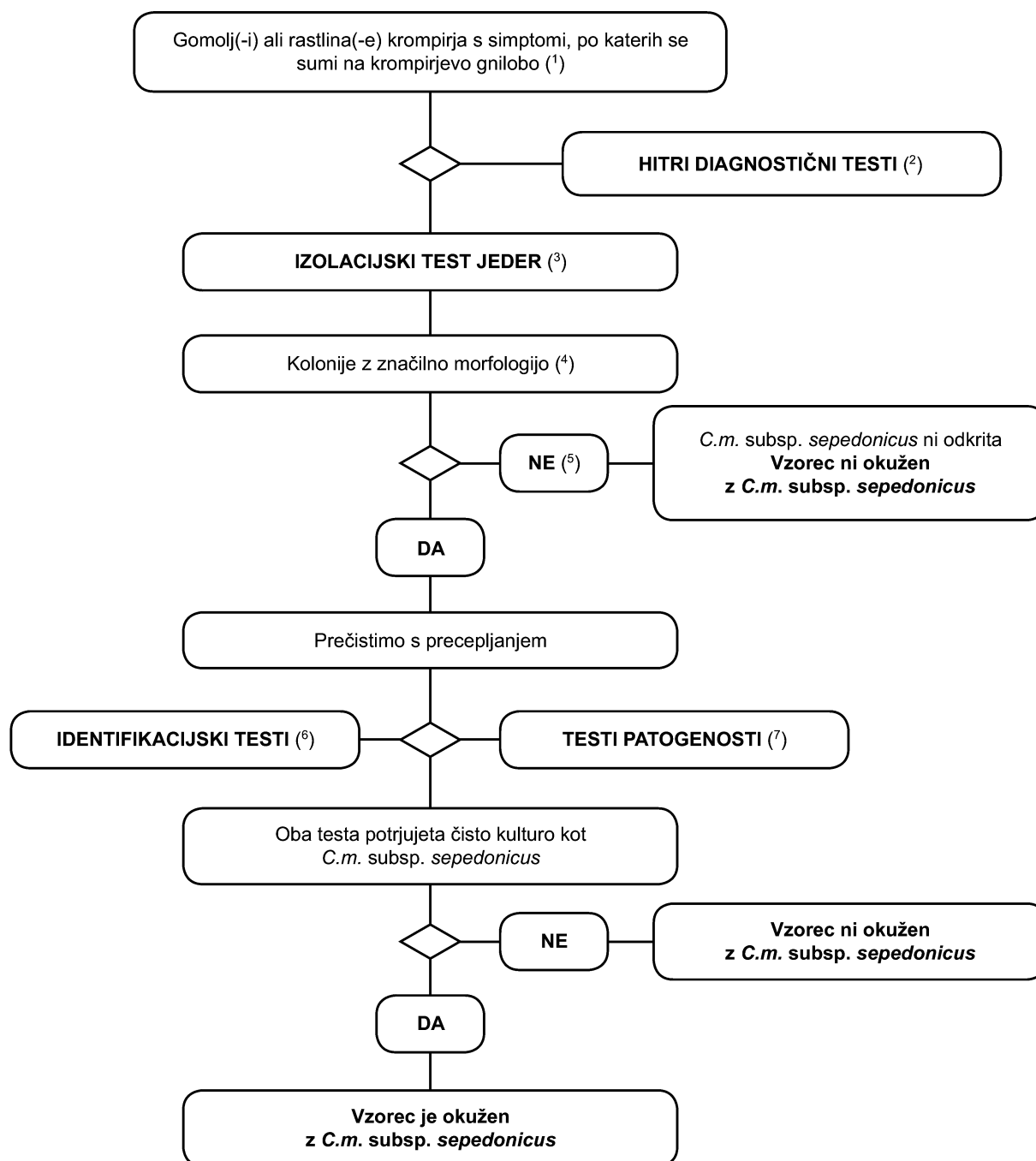
Če je prvi presejalni test (IF ali PCR/FISH) pozitiven, potem se sumi na okužbo z bakterijo *Cms* in opraviti se mora drugi presejalni test. Če je drugi presejalni test pozitiven, potem je sum potrjen (domnevni pojav) in testiranje v skladu s shemo se mora nadaljevati. Če je drugi presejalni test negativen, potem se šteje, da vzorec ni okužen z bakterijo *Cms*.

Torej je pozitiven IF test, kot je določen v členu 4(2) Direktive 93/85/EGS, opredeljen kot pozitiven rezultat IF, ki je potrjen z drugim presejalnim testom (PCR/FISH).

Potrjena navzočnost, kot je določena v členu 5(1) Direktive 93/85/EGS pomeni izolacijo in identifikacijo čiste kulture *C. m.* subsp. *sepedonicus* s potrditvijo patogenosti.

1. PREDSTAVITEV S PUŠČIČNIMI DIAGRAMI**1.1 Shema odkrivanja za diagnosticiranje obročkaste gnilobe v gomoljih in rastlinah krompirja s simptomi obročkaste gnilobe**

Postopek testiranja je namenjen gomoljem in rastlinam krompirja z značilnimi simptomi obročkaste gnilobe ali simptomi, ki vzbujajo sum na obročkasto gnilobo. Vključuje hitri presejalni test, izolacijo patogena iz okuženega vaskularnega tkiva na diagnostičnem gojišču in v primeru pozitivnega rezultata identifikacijo kulture kot bakterije *C. m.* subsp. *sepedonicus*.



(1) Opis simptomov je naveden v oddelku 2.

(2) Primerni testi so:
— test IF (oddelek 4),
— test PCR (oddelek 6),
— test FISH (oddelek 5).

(3) Čeprav je izolacija patogena iz rastlinskega materiala z značilnimi simptomi z razmazom razredčine preprosta, lahko kultiviranje spodleti pri naprednih fazah okužbe. Saprofitske bakterije, ki rastejo na obolelem tkivu, lahko prerastejo ali inhibirajo patogene na izolacijskem gojišču. Zato je priporočljivo uporabiti tako neselektivno kot selektivno gojišče, po možnosti MTNA (oddelek 8) ali biološki test (oddelek 7).

(4) Opis značilne morfologije kolonije je naveden v oddelku 8.

(5) Če je izolacijski test negativen, simptomi bolezn pa so značilni, je treba postopek izolacije ponoviti.

(6) Zanesljiva identifikacija čiste kulture *C.m. subsp. sepedonicus* se doseže z uporabo testov, naštetih v oddelku 9.

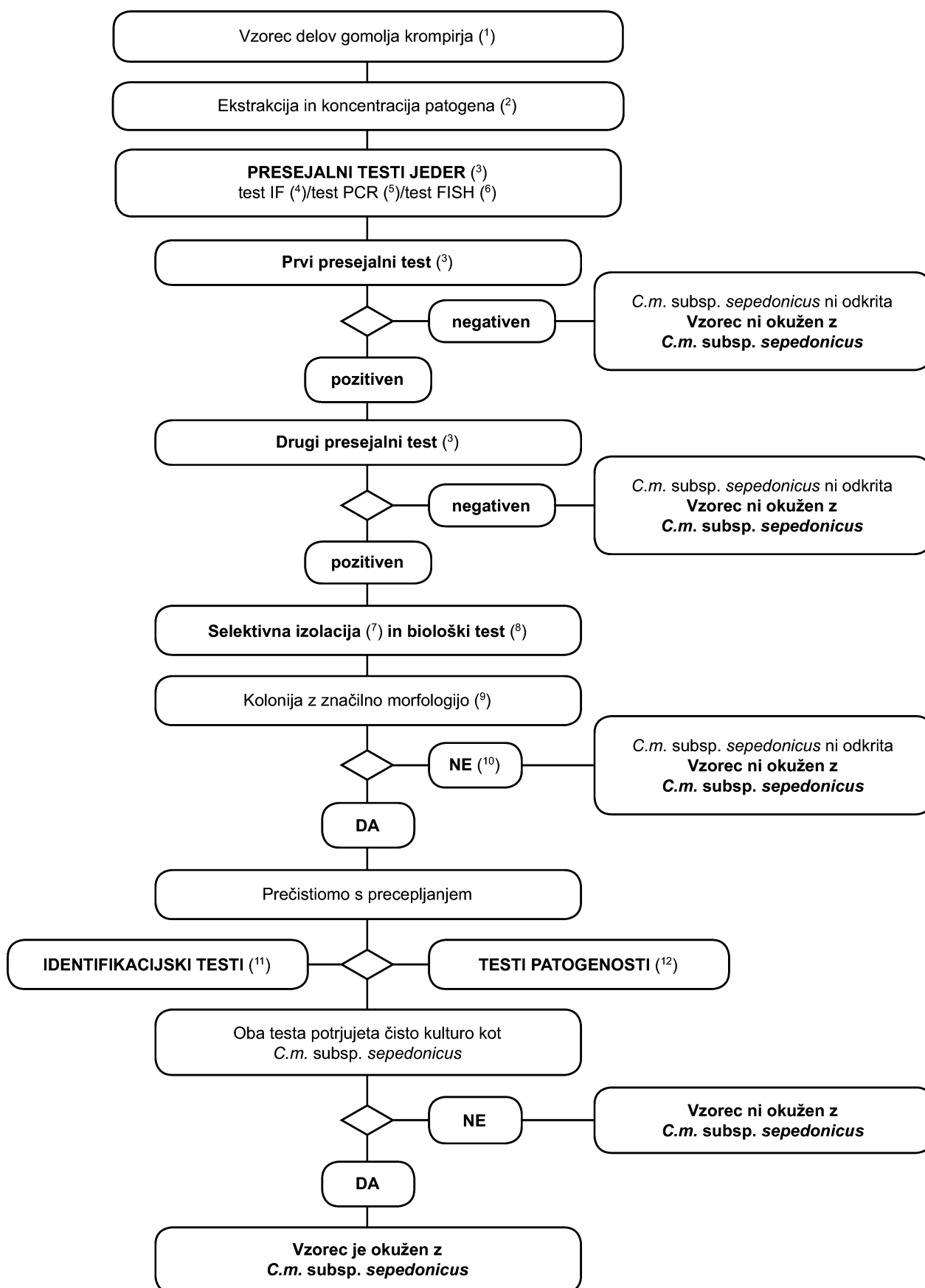
(7) Test patogenosti je opisan v oddelku 10.

1.2 **Shema za odkrivanje in identifikacijo bakterije *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* v vzorcih asimptomatičnih gomoljev krompirja**

Načelo

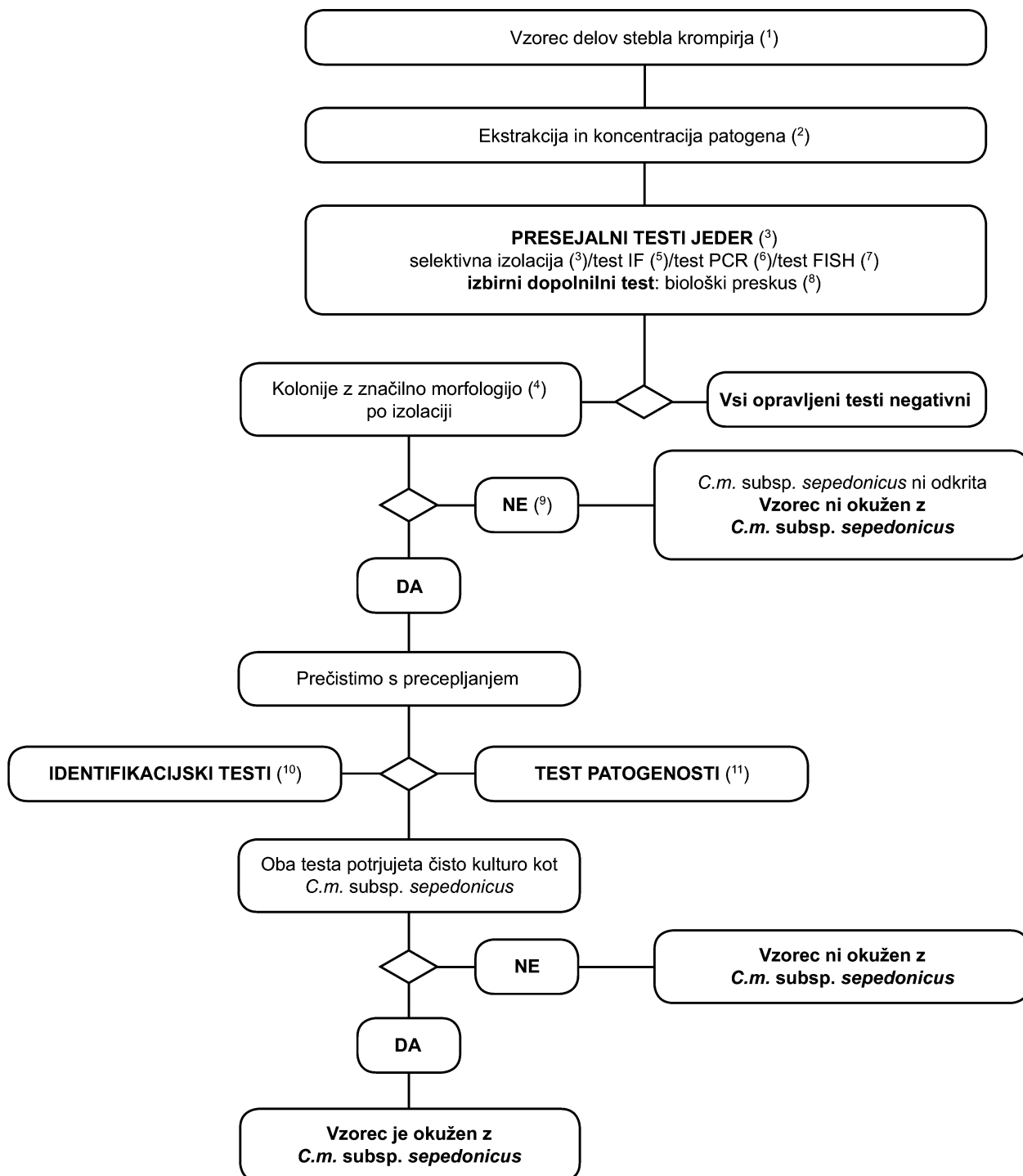
Postopek testiranja je namenjen odkrivanju latentnih okužb v gomoljih krompirja. Pozitiven rezultat vsaj dveh presejalnih testov, ki temeljita na različnih bioloških načelih, mora biti dopolnjen z izolacijo patogena, ki ji v primeru izolacije tipičnih kolonij sledi potrditev čiste kulture kot *C. m.* subsp. *sepedonicus*. Pozitiven rezultat samo enega presejalnega testa ni dovolj, da bi vzorec obravnavali kot sumljiv.

Presejalni testi in izolacijski testi morajo dopuščati prag odkrivanja 10^3 do 10^4 celic/ml resuspendirane pelete, vključene kot pozitivne kontrole v vsaki seriji testov.



- (¹) Standardna velikost je 200 gomoljev. Vendar je ta postopek mogoče ustrezno uporabiti tudi za vzorce z manj kot 200 gomolji, če jih toliko ni na voljo.
- (²) Metode ekstrakcija in koncentracije patogena so opisane v oddelku 3.1.
- (³) Če sta vsaj dva testa, ki temeljita na različnih bioloških načelih, pozitivna, je treba opraviti izolacijo in potrditev. Opravimo vsaj en presejalni test. Če je ta test negativen, se vzorec šteje za negativnega. Če je ta test pozitiven, je treba opraviti drugi ali več presejalnih testov, ki temeljijo na različnih bioloških načelih, da se preveri prvi pozitivni rezultat. Če so drugi test ali ostali testi negativni, se vzorec šteje za negativnega. Nadaljnji testi niso potrebni.
- (⁴) Imunofluorescenčni (IF) test.
Vedno uporabimo poliklonsko protiteleso za presejanje IF, dodatna monoklonska protitelesa lahko zagotovijo večjo specifičnost (glej oddelek 4).
- (⁵) Test PCR.
Uporabimo ustrezno potrjene reagentne in protokole PCR (glej oddelek 6).
- (⁶) Test Fish.
Uporabimo potrjene reagentne in protokole (glej oddelek 5).
- (⁷) Selektivna izolacija.
Z gojiščem MTNA ali NCP-88 in 1/100 razredčino resuspendirane pelete je to v mnogih primerih ustrezna metoda za neposredno izolacijo *C. m. subsp. sepedonicus*. Značilne kolonije se lahko pridobijo 3–10 dni po pripravi vzorca. Patogen se potem lahko prečisti in identificira. Za popolnoma izkoriščeno zmogljivost testa je potrebna natančna priprava jedra stolona, da se izognemo sekundarnim bakterijam, povezanim z gomoljem krompirja, ki na gojišču tekmujejo z bakterijo *C. m. subsp. sepedonicus* in prerastejo patogene. Če test z razmazom na gojišče spodleti, se mora izolacija opraviti iz rastlin, ki se uporabijo za biološki test (glej oddelek 8).
- (⁸) Biološki test se uporablja za izolacijo bakterije *C. m. subsp. sepedonicus* iz pelet krompirjevega ekstrakta s selektivno obogatitvijo v jajčevcih (*Solanum melongena*). Test zahteva optimalne pogoje inkubacije, kakor jih opredeljuje metoda. Bakterije, ki inhibirajo bakterijo *C. m. subsp. sepedonicus* na gojišču MTNA ali NCP-88, testa najverjetneje ne bodo motile (glej oddelek 7).
- (⁹) Značilna morfologija kolonije je opisana v oddelku 8.
- (¹⁰) Kultiviranje ali biološki testi lahko spodletijo zaradi tekmovanja ali inhibicije sprofitskih bakterij. Če s presejalnimi testi dobimo pozitivne rezultate, izolacijski testi pa so negativni, ponovimo izolacijski test iz iste pelete ali z odvzemom dodatnega vaskularnega tkiva blizu stolona razrezanih gomoljev istega vzorca in po potrebi testiramo dodatne vzorce.
- (¹¹) Zanesljiva identifikacija čistih kultur domnevne *C. m. subsp. sepedonicus* se doseže z uporabo testov, opisanih v oddelku 9.
- (¹²) Test patogenosti je opisan v oddelku 10.

1.3 Shema za odkrivanje in identifikacijo bakterije *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* v vzorcih asimptomatičnih rastlin krompirja



- (¹) Za priporočene velikosti vzorcev glej oddelek 3.2.
- (²) Metode ekstrakcije in koncentracije patogena so opisane v oddelku 3.2.
- (³) Če sta vsaj dva testa, ki temeljita na različnih bioloških načelih, pozitivna, je treba opraviti izolacijo in potrditev. Opravimo vsaj en presejalni test. Če je ta test negativen, se vzorec šteje za negativnega. Če je ta test pozitiven, je treba opraviti drugi ali več presejalnih testov, ki temeljijo na različnih bioloških načelih, da se preveri prvi pozitiven rezultat. Če so drugi test ali ostali testi negativni, se vzorec šteje za negativnega. Nadaljnji testi niso potrebni.
- (⁴) Test selektivne izolacije in značilna morfologija kolonije je opisana v oddelku 8.
- (⁵) Test IF je opisan v oddelku 4.
- (⁶) Testi PCR so opisani v oddelku 6.
- (⁷) Test FISH je opisan v oddelku 5.
- (⁸) Biološki test je opisan v oddelku 7.
- (⁹) Kultiviranje ali biološki testi lahko spodletijo zaradi tekmovanja ali inhibicije sprofitskih bakterij. Če s presejalnimi testi dobimo pozitivne rezultate, izolacijski testi pa so negativni, ponovimo izolacijski test in po potrebi testiramo dodatne vzorce.
- (¹⁰) Zanesljiva identifikacija čistih kultur domnevne *C. m. subsp. sepedonicus* se doseže z uporabo testov, opisanih v oddelku 9.
- (¹¹) Test patogenosti je opisan v oddelku 10.

2. VIZUALNI PREGLED ZA ODKRIVANJE SIMPTOMOV OBROČKASTE GNILOBE

2.1 Rastline krompirja

V evropskih vremenskih razmerah redko najdemo simptome na polju in pogosto samo ob koncu sezone. Poleg tega so simptomi pogosto prikriti ali se zamenjujejo z drugimi boleznimi, staranjem ali mehanskimi poškodbami. Zato lahko zlahka spregledamo simptome na terenskih uradnih pregledih. Simptomi venačenja so precej različni od simptomov rjave gnilobe; venačenje je običajno počasno in na začetku omejeno na robove listov. Mladi okuženi listi se še naprej razvijajo, čeprav manj na okuženih območjih. To povzroča čudno oblikovane liste. Listi, prizadeti z blokado vaskularnega tkiva na spodnjem delu stebela, imajo pogosto klorotične, rumeno oranžne vmesne dele. Okuženi lističi, listi in celo stebela lahko sčasoma odmrejo. Pogosto so listi in gomolji samo manjše velikosti. Včasih so rastline okrnjene. Barvne slike razpona simptomov so dostopne na spletni strani: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

2.2 Gomolji krompirja

Prvi simptomi so rahlo steklast videz ali prosojnost tkiva brez omejitve okoli vaskularnega sistema, predvsem v bližini stolona. Vaskularni obroček na stolonu je lahko rahlo temnejše barve kot ponavadi. Prvi lahko prepoznavni simptom predstavlja rumenkasto obarvan vaskularni obroček in če gomolj rahlo stisnemo, se iz žil pcedijo majhne količine siraste mase. Ta izcedek vsebuje na milijone bakterij. V tej fazi se lahko vaskularno tkivo obarva rjavo in simptomi gomolja so podobni simptomom rjave gnilobe, ki jo povzroča *Ralstonia solanacearum*. Ti simptomi so lahko sprva omejeni le na del obročka, ki ni nujno v bližini stolona, in se lahko postopoma razširijo na celoten obroček. Z napredovanjem okužbe se pojavi uničenje vaskularnega tkiva; zunanji korteks se lahko oddvoji od notranjega korteksa. V poznejših fazah okužbe se na površini gomolja pojavijo razpoke, ki so ob robu pogosto rdečkastorjave barve. V zadnjem času se je v Evropi pojavilo nekaj primerov, ko je osrednji korteks gnil istočasno kot vaskularni obroček, kar je pripeljalo do sekundarnega napada z notranjim votlenjem in nekrozo. Sekundarni napad gliv ali bakterij lahko prikrije simptome in tako oteži ali onemogoči razločevanje simptomov obročkaste gnilobe v poznem stadiju od ostalih gnilob gomoljev. Možni so neznačilni simptomi. Barvne slike razpona simptomov so dostopne na spletni strani: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

3. PRIPRAVA VZORCEV

3.1 Gomolji krompirja

Opomba:

- Standardna velikost vzorca je 200 gomoljev na test. Intenzivnejše vzorčenje zahteva več testov na vzorcih te velikosti. Večje število gomoljev v vzorcu bo povzročilo inhibicijo ali otežilo interpretacijo rezultatov. Vendar pa se postopek lahko ustrezno uporabi za vzorce z manj kot 200 gomolji, če je na voljo manj gomoljev.
- Potrditev vseh spodaj opisanih metod odkrivanja temelji na testiranju vzorca z 200 gomolji.
- Spodaj opisani krompirjev ekstrakt se lahko uporabi tudi za odkrivanje bakterije krompirjeve rjave gnilobe, *Ralstonia solanacearum*.

Izbirna vnaprejšnja predobdelava pred pripravo vzorca:

Operemo gomolje. Uporabimo ustrezna razkužila (klorove spojine, kadar se uporabi test PCR, da se odstrani morebitno patogeno DNK) in detergente med vsakim vzorcem. Gomolje posušimo na zraku. Ta postopek pranja je zlasti koristen (vendar ni obvezen) pri vzorcih z odvečno zemljo in če se bosta izvedla test PCR ali postopek neposredne izolacije.

- 3.1.1 S čistim in razkuženim skalpelom ali nožem za zelenjavo odstranimo povrhnjico na območju stolona vsakega gomolja, tako da vaskularno tkivo postane vidno. Previdno izrežemo majhno jedro vaskularnega tkiva na območju stolona in pazimo, da je nevaskularnega tkiva čim manj (glej spletno stran: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>)

Opomba:

Ločimo vse gomolje s sumljivimi simptomi obročkaste gnilobe in posebej testiramo.

Če med odstranitvijo jedra stolona opazimo sumljive simptome obročkaste gnilobe, je treba ta gomolj prerezati blizu stolona in ga vizualno pregledati. Vsak prerezan gomolj s sumljivimi simptomi je treba suberizirati na sobni temperaturi dva dni in nato shraniti v karanteni (pri 4 do 10 °C), dokler niso vsi testi končani. Vsi gomolji v vzorcu, vključno tisti s sumljivimi simptomi, se shranjujejo v skladu s Prilogo II.

3.1.2 Jedra stolonov damo v neuporabljene posode za enkratno uporabo, ki jih lahko zapremo in/ali hermetično zapremo (če se posode večkrat uporabijo, jih moramo temeljito očistiti in razkužiti s klorovimi spojinami). Zaželeno je, da se jedra stolonov obdelajo takoj. Če to ni mogoče, jih shranimo v posodi brez dodanega pufru v hladilniku za največ 72 ur ali na sobni temperaturi ne več kot 24 ur. Sušenje in suberizacija jeder ter rast saprofitov med shranjevanjem lahko ovira odkritje bakterije obročkaste gnilobe.

3.1.3 Jedra stolonov obdelamo po enem od naslednjih postopkov:

(a) Prekrijemo jedra z zadostno količino (približno 40 ml) ekstrakcijskega pufru (Dodatek 3) in pretresemo na rotacijskem stresalniku (50-100 vrt/min) 4 ure pri temperaturi pod 24 °C in 16 do 24 ur pri temperaturi hladilnika,

ali

(b) homogeniziramo jedra z zadostno količino (približno 40 ml) ekstrakcijskega pufru (Dodatek 3), bodisi v mešalcu (npr. Waring ali Ultra Thurax) ali pa jih zmeljemo v zaprti meceracijski vrečki za enkratno uporabo (npr. močan tesnilni politen Stomacher ali Bioreba, 150 mm × 250 mm; steriliziran z obsevanjem), pri čemer uporabimo gumijast bat ali ustrezno aparaturo za mletje (npr. Homex).

Opomba:

Če se vzorci homogenizirajo z mešalcem, je tveganje navzkrižne okužbe vzorcev veliko. Z ustreznimi ukrepi se ognemo nastajanju pršenja ali razlitju med postopkom ekstrakcije. Za vsak vzorec moramo uporabiti sveže razkužena rezila in posodo mešalca. Če uporabljamo test PCR, se moramo izogibati prenosu DNK na posodah ali aparaturah za mletje. Mletje v vrečkah za enkratno uporabo in uporaba cevka za enkratno uporabo se priporoča pri testu PCR.

3.1.4 Odljemo supernatant. V primeru prevelike motnosti, sčistimo s počasnim centrifugiranjem (ne več kot 180 g za 10 min pri temperaturi 4 do 10 °C) ali z vakumsko filtracijo (40 do 100 µm), pri čemer filter operemo z dodatnim (10 ml) ekstrakcijskim pufrom (Dodatek 3).

3.1.5 Skoncentriramo bakterijsko frakcijo s centrifugiranjem na 7 000 g 15 minut (ali 10 000 g 10 minut) pri temperaturi 4 do 10 °C in odljemo supernatant brez premešavanja pelete.

3.1.6 Resuspendiramo peleto v 1,5 ml peletnega pufru (Dodatek 3). Uporabimo 500 µl za testiranje *C. m. subsp. sepedonicus*, 500 µl za *Ralstonia solanacearum* in 500 µl za referenčne namene. Dodamo sterilni glicerol končni koncentraciji 10-25 % (v/v) 500 µl referenčnega alikvota in preostanku testnega alikvota, premešamo z vrtnčenjem in shranimo pri -16 do -24 °C (tedni) ali pri -68 do -86 °C (meseci). Testne alikvote hranimo pri 4 do 10 °C med testiranjem.

Večkratno zamrzovanje in tajanje ni priporočljivo.

Če je potreben transport ekstrakta, zagotovimo dostavo v hladilni skrinji v 24-ih do 48-ih urah.

3.1.7 Zelo pomembno je, da se pozitivne kontrole in vzorci *C. m. subsp. sepedonicus* obravnavajo ločeno, da se izognemo okužbi. To velja za stekelca IF in vse teste.

3.2 Rastline Krompirja

Opomba:

Za odkrivanje latentnih populacij *C. m. subsp. sepedonicus*, je priporočljivo testirati sestavljene vzorce. Postopek se lahko ustrezno uporabi za sestavljene vzorce z do 200 delov stebel. (Kadar se opravljajo raziskave, morajo temeljiti na statistično reprezentativnem vzorcu rastlinske populacije, ki jo proučujemo.)

3.2.1 S čistim razkuženim nožem ali vrtnarskimi škarjami odstranimo 1-2 centimetrski del iz spodnjega dela stebela, tik nad površino zemlje.

Na kratko razkužimo dele stebel s 70 % etanolom in nemudoma popivnemo s pivnim papirjem.

Dele stebel damo v zaprto sterilno posodo v skladu z naslednjimi postopkom vzorčenja:

3.2.2 Dele stebel obdelamo po enem od naslednjih postopkov:

(a) Prekrijemo delce z zadostno količino (približno 40 ml) ekstrakcijskega pufra (Dodatek 3) in pretresemo na rotacijskem stresalniku (50-100 vrt/min) 4 ure pri temperaturi pod 24 °C in 16 do 24 ur pri temperaturi hladilnika;

ali

(b) nemudoma obdelamo z mletjem delov v močni maceracijski vrečki (npr. Stomacher ali Bioreba) z ustrezno količino ekstrakcijskega pufra (Dodatek 3) in gumijastim batom ali ustrezno aparaturo za mletje (npr. Homex). Če to ni mogoče, shranimo dele stebel v hladilniku za največ 72 ur ali za največ 24 ur na sobni temperaturi.

3.2.3 Odlijemo supernatant, potem ko pustimo 15 minut, da se usedlina usede.

3.2.4 Nadaljnje čiščenje ekstrakta ali koncentracije bakterijske frakcije navadno ni potrebno, lahko pa ga dosežemo s filtriranjem in/ali centrifugiranjem, kot je opisano v oddelku 3.1.4 do 3.1.6.

3.2.5 Razdelimo čisti ali koncentriran ekstrakt vzorca na dva enaka dela. Eno polovico med testiranjem hranimo pri 4 do 10 °C, drugo pa shranimo z 10-25 % (v/v) sterilnim glicerolom pri – 16 do – 24 °C (tedni) ali pri – 68 do – 86 °C (meseci), če je potrebno nadaljnje testiranje.

4. TEST IF

Načelo

Uporaba testa IF kot glavnega presejalnega testa je priporočena, ker je dokazano obstojen pri doseganju zahtevanih pragov.

Kadar se uporabi test IF kot glavni presejalni test in je odčitek IF pozitiven, se kot drugi presejalni test opravi test PCR ali FISH. Kadar se test IF uporabi kot drugi presejalni test in je odčitek IF pozitiven, je za dokončanje analize potrebno nadaljnje testiranje v skladu z diagramom poteka.

Opomba:

Vedno uporabimo poliklonsko protiteleso, kadar se test IF uporabi kot glavni presejalni test. V primeru pozitivnega odčitka IF pri poliklonskem protitelesu nadaljnje preverjanje vzorca z monoklonskim protitelesom lahko poskrbi za večjo natančnost vendar je lahko manj občutljivo.

Uporabimo protitelesa na referenčni sev *C. m. subsp. sepedonicus*. Priporočljivo je, da se titer določi za vsako novo serijo protiteles. Titer je opredeljen kot največja razredčina, pri kateri se doseže optimalna reakcija, kadar testiramo suspenzijo z 10^5 do 10^6 celic na ml homolognega seva *C. m. subsp. sepedonicus* in uporabljamo ustrezno razredčino fluorescein izotiocianatovega (FITC) konjugata v skladu z navodili proizvajalca. Surova poliklonska ali monoklonska protitelesa morajo imeti titer IF vsaj 1:2 000. Med testiranjem je treba protitelesa uporabljati na delovni(-ih) razredčini(-ah), ki je (so) blizu ali enaka(-e) titru. Uporabimo potrjena protitelesa (glej spletno stran <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Test je treba opravi na sveže pripravljenih ekstraktih vzorcev. Če je potrebno, se lahko uspešno opravi na ekstraktih, hranjenih pri – 68 do – 86 °C pod glicerolom. Glicerol se lahko odstrani iz vzorca z dodajanjem 1 ml peletnega pufra (Dodatek 4), ponovnim 15-minutnim centrifugiranjem na 7 000 g in resuspenzijo v enaki prostornini peletnega pufra. To pogosto ni potrebno, zlasti če so vzorci na objektna stekelca fiksirani nad plamenom (glej 2.2).

Pripravimo ločena objektna stekelca pozitivne kontrole homolognega seva ali katerega koli referenčnega seva *C. m. subsp. sepedonicus*, suspendiranega v ekstraktu krompirja, kot je določeno v Dodatku 2, ali po izbiri v pufru.

Če je mogoče, uporabimo naravno okuženo tkivo (ohranjeno z liofilizacijo ali zamrznitvijo pri temperaturi – 16 do – 24 °C) kot podobno kontrolo na istem objektnem stekelcu.

Za negativne kontrole uporabimo alikvote ekstrakta vzorca, ki je bil predhodno testiran z negativnim rezultatom.

Uporabimo mikroskopska objektna stekelca z več vdolbinicami z po možnosti 10 okenci premera vsaj 6 mm.

Kontrolni material testiramo na enak način kot vzorec ali vzorce.

4.1 Testna objektna stekelca pripravimo po enem od naslednjih postopkov:

(i) Za pelete z relativno majhno škrobno usedlino:

S pipeto kanemo odmerjeno standardno količino (15 μ l je primerno za okenca s premerom 6 mm - povečamo količino za večja okenca) razredčine 1/100 resuspendirane krompirjeve pelete na prvo okence. Nato s pipeto kanemo podobno količino nerazredčene pelete (1/1) na preostala okenca v vrsti. Druga vrsta se lahko uporabi kot ponovitev ali za drugi vzorec, kot je prikazano na sliki 1.

(ii) Za druge pelete:

Pripravimo desetkratne razredčine (1/10 in 1/100) resuspendirane pelete v peletnem pufru. S pipeto kanemo odmerjeno standardno količino (15 μ l je primerno za okenca s premerom 6 mm - povečamo količino za večja okenca) resuspendirane pelete in vsake razredčine na vrsto okenc. Druga vrsta se lahko uporabi kot ponovitev ali za drugi vzorec, kot je prikazano na sliki 2.

4.2 Kapljice posušimo na sobni temperaturi ali s segrevanjem pri temperaturah od 40 do 45 °C. Fiksiramo bakterijske celice na objektno stekelce bodisi s segrevanjem (15 min pri 60 °C), nad plamenom, s 95-odstotnim etanolom ali v skladu s posebnimi navodili dobavitelja protiteles.

Po potrebi se fiksirana objektna stekelca lahko shranijo zmrznjena v sušilni posodi, za kolikor je mogoče kratek čas (do največ 3 mesece) pred nadaljnjim testiranjem.

4.3 Postopek IF:

(i) V skladu s pripravo objektnih stekelc v 4.1(i):

Pripravimo niz dvakratnih razredčin protitelesa v pufru IF. Prva vdolbinica mora imeti 1/2 titra (T/2), druge pa 1/4 titra (T/4), 1/2 titra (T/2), titer (T) in dvakratni titer (2T).

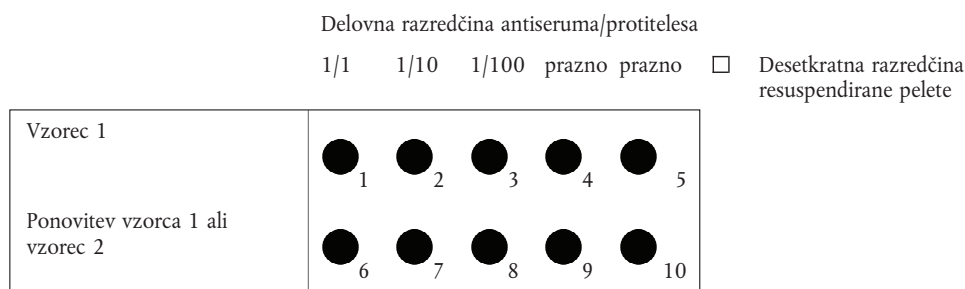
(ii) V skladu s pripravo objektnih stekelc v 4.1(ii):

Pripravimo delovno razredčino (WD) protitelesa v pufru IF. Delovna razredčina vpliva na specifičnost.

Slika 1. Priprava testnega objektnega stekelca v skladu s 4.1(i) in 4.3(i)

	Razredčine resuspendirane pelete					
	1/100	1/1	1/1	1/1	1/1	<input type="checkbox"/> Razredčina resuspendirane pelete
(T = titer)	T/2	T/4	T/2	T	2T	<input type="checkbox"/> Dvakratne razredčine antiseruma/protitelea
Vzorec 1	● ₁	● ₂	● ₃	● ₄	● ₅	
Ponovitev vzorca 1 ali vzorec 2	● ₆	● ₇	● ₈	● ₉	● ₁₀	

Slika 2. Priprava testnega objektnega stekelca v skladu s 4.1(ii) in 4.3(ii)



4.3.1 Objektna stekelca razporedimo po vlažnem papirju. Vsako testno okence popolnoma prekrijemo z razredčino ali razredčinami protiteles. Količina protiteles, ki se nanese na vsako okence, mora biti vsaj enaka količini uporabljene ekstrakta.

Kadar ni posebnih navodil od dobavitelja protiteles, se izvede naslednji postopek:

4.3.2 Inkubiramo objektna stekelca na vlažnem papirju v komori pri sobni temperaturi (18 do 25 °C) 30 minut.

4.3.3 Otresemo kapljice z vsakega objektnega stekelca in pazljivo splaknemo s pufrom IF. Operemo, tako da potopimo za 5 minut v pufer IF-Tween (Dodatek 3) in nato za 5 minut v pufer IF. Izogibamo se povzročanju pršenja in prenašanju kapljic, ki bi lahko povzročilo navzkrižno okužbo. Pazljivo odstranimo odvečno vlago z nežnim pivnanjem.

4.3.4 Objektna stekelca razporedimo po vlažnem papirju. Testna okenca prekrijemo z razredčino konjugata FITC, ki se uporablja za določitev titra. Količina konjugata, nanesenega na okenca, mora biti enaka količini nanesenega protitelesa.

4.3.5 Inkubiramo objektna stekelca na vlažnem papirju v komori pri sobni temperaturi (18 do 25 °C) 30 minut.

4.3.6 Otresemo kapljice konjugata z objektnega stekelca. Splaknemo in operemo tako kot prej (4.3.3).

Pazljivo odstranimo odvečno vlago.

4.3.7 S pipeto kanemo 5 do 10 µl 0,1 M glicerola s fosfatnim pufrom (Dodatek 3) ali komercialno prekrivno sredstvo proti bledenju in pokrijemo s krovnim stekelcem.

4.4 Branje testa IF:

4.4.1 Pregledamo objektna stekelca pod mikroskopom, opremljenim z virom epifluorescentne svetlobe in filtri, ki so primerni za vzbujanje FITC, v imerzijskem olju ali vodi, pri povečavi 500–1 000. Okenca pregledamo po črtah dveh pravokotnih premerov in po obodu. Pri vzorcih, ki nimajo ali imajo majhno število celic, pregledamo vsaj 40 mikroskopskih polj.

Najprej pregledamo objektno stekelce pozitivne kontrole. Celice morajo biti svetlo fluorescentne in popolnoma obarvane pri določenem titru protiteles ali delovni razredčini. Test IF (oddelek 4) se mora ponoviti v primeru odstopanja pri obarvanju.

4.4.2 Iščevo svetlo fluorescentne celice z značilno morfologijo *C. m. subsp. sepedonicus* v testnih okencih testnih objektnih stekelc (glej spletno stran <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Intenzivnost fluorescence mora biti enaka ali večja kot pri sevu pozitivne kontrole pri enaki razredčini protitelesa. Celice, ki niso popolnoma obarvane, ali s šibko fluorescenco, se ne upoštevajo.

Če se sumi na okužbo, se test ponovi. To se lahko zgodi v primeru, ko vsa objektna stekelca v seriji kažejo pozitivne celice zaradi okužbe pufru ali če odkrijemo pozitivne celice (zunaj okenca objektnega stekelca) na zgornji plasti objektnega stekelca.

4.4.3 S specifičnostjo imunofluorescentnega testa je povezanih nekaj težav. V peletah jedra stolona in delov stebel krompirja se bodo verjetno pojavile populacije fluorescentnih celic ozadja z neznačilno morfologijo in navzkrižno reagirajoče saprofitske bakterije, podobne velikosti in morfologije kot *C. m. sepedonicus*.

4.4.4 Upoštevam samo fluorescentne celice značilne velikosti in morfologije v titru ali delovni razredčini protiteles kot v 4.3.

4.4.5 Interpretacija odčitka IF:

- (i) Če najdemo svetlo fluorescentne celice z značilno morfologijo, ocenimo povprečno število značilnih celic na mikroskopsko polje in izračunamo število značilnih celic na ml resuspendirane pelete (Dodatek 4).

Odčitek IF je pozitiven pri vzorcih z vsaj 5×10^3 značilnih celic na ml resuspendirane pelete. Vzorec se šteje za potencialno okuženega in potrebno je nadaljnje testiranje.

- (ii) Odčitek IF je negativen pri vzorcih z manj kot 5×10^3 celic na ml resuspendirane pelete in vzorec se šteje za negativnega. Nadaljnje testiranje ni potrebno.

5. TEST FISH

Načelo

Kadar se uporabi test FISH kot glavni presejalni test in je rezultat pozitiven, se kot obvezni drugi presejalni test opravi test IF. Kadar se test FISH uporabi kot drugi presejalni test in je rezultat pozitiven, je za končno diagnozo potrebno nadaljnje testiranje v skladu z diagramom poteka.

Opomba:

Uporabimo potrjene oligo-sonde, specifične za *C. m. subsp. sepedonicus* (Dodatek 7). Predhodno testiranje s to metodo mora omogočati ponovljivo odkrivanje vsaj 10^3 do 10^4 celic *C. m. subsp. sepedonicus* na ml dodano ekstraktom vzorcev, ki so bili prej testirani z negativnim rezultatom.

Naslednji postopek je najbolje izvesti na sveže pripravljenem ekstraktu vzorca, vendar ga prav tako lahko uspešno izvedemo na ekstraktu vzorca, ki je bil predhodno shranjen pri -16 do -24 °C ali -68 do -86 °C pod glicerolom.

Za negativne kontrole uporabimo alikvote ekstrakta vzorca, ki je bil predhodno testiran z negativnim rezultatom na *C. m. subsp. sepedonicus*.

Za pozitivne kontrole pripravimo suspenzije, ki vsebujejo 10^5 do 10^6 celic na ml *C. m. subsp. sepedonicus* (npr. sev NCPPB 4053 ali PD 406) v 0,01 M fosfatnega pufra (PB) iz 3- do 5-dnevne kulture (za pripravo glej Dodatek 2). Pripravimo ločena objektna stekelca pozitivne kontrole homolognega seva ali katerega drugega referenčnega seva *C. m. subsp. sepedonicus*, suspendiranega v ekstraktu krompirja, kot je določeno v Dodatku 2.

Uporaba evbakterijske oligo-sonde z oznako FITC nudi kontrolo za proces hibridizacije, saj obarva vse evbakterije, ki se nahajajo v vzorcu.

Kontrolni material testiramo na enak način kot vzorec ali vzorce.

5.1 Fiksacija ekstrakta krompirja

Naslednji protokol temelji na Wullings in drugi, (1998):

5.1.1 Pripravimo fiksirno raztopino (glej Dodatek 7).

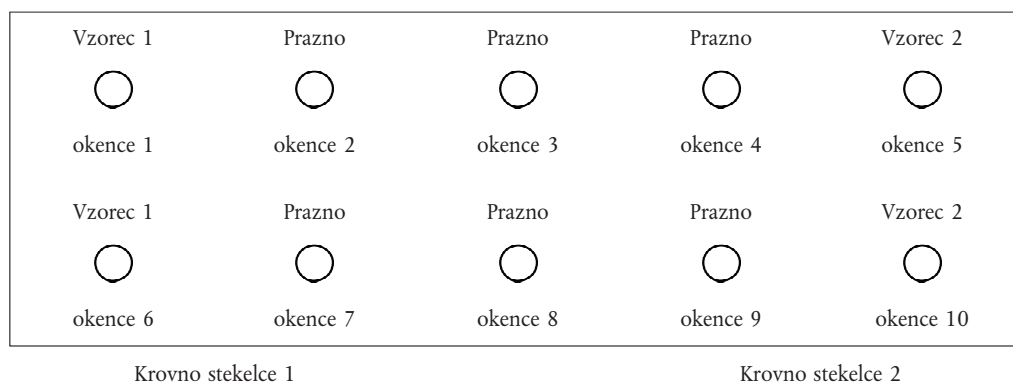
5.1.2 S pipeto kanemo 100 µl vsakega ekstrakta vzorca v Eppendorfovo epruveto in centrifugiramo 8 min na 7 000 g.

5.1.3 Odlijemo supernatant in raztopimo peleto v 500 µl preparata za fiksiranje, pripravljenega manj kot 24 ur pred tem. Premešamo z vrtničenjem in inkubiramo čez noč pri 4 °C.

Alternativni preparat za fiksiranje je 96 % etanol. Pri tem je treba raztopiti peleto iz stopnje 5.1.2 v 50 µl 0,01 M PB in 50 µl 96 % etanola. Premešamo z vrtničenjem in inkubiramo 30 do 60 minut pri 4 °C.

- 5.1.4 Centrifugiramo 8 minut pri 7 000 g, odlijemo supernatant in resuspendiramo pelet v 75 μ l 0,01 M PB (glej Dodatek 3).
- 5.1.5 Kanemo 16 μ l fiksirane suspenzije na čisto multitestno objektno stekelce, kot je prikazano na sliki 3. Za vsako objektno stekelce uporabimo 2 različna nerazredčena vzorca in uporabimo 10 μ l za pripravo razredčine 1:100 (v 0,01 M PB). Preostala raztopina vzorca (49 μ l) se lahko shrani pri -20°C , potem ko dodamo eno količino 96 % etanola. V primeru, ko je treba preskušanje FISH ponoviti, odstranimo etanol s centrifugiranjem in dodamo enako količino 0,01 M PB (premešamo z vrtnčenjem).

Slika 3 Razporeditev za objektno stekelce FISH



- 5.1.6 Objektne stekelce posušimo na zraku (ali v sušilniku za stekelca pri 37°C) in jih fiksiramo nad plamenom.

Na tej stopnji se postopek lahko prekine in nadaljuje s hibridizacijo naslednji dan. Objektne stekelce se shranijo v prostoru brez prahu in na suhem pri sobni temperaturi.

5.2 Predhibridizacija in hibridizacija

- 5.2.1 Pripravimo raztopino lizocima, ki vsebuje 10 mg lizocima (Sigma L-6876) v 10 ml pufru (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8,0). Ta raztopina se lahko shrani, vendar jo lahko samo enkrat zamrzemo in odtalimo. Vsak vzorec dobro prekrijemo s približno 50 μ l raztopine lizocima in 10 minut inkubiramo pri sobni temperaturi. Nato samo enkrat pomočimo objektne stekelce v demineralizirano vodo in osušimo s filtrirnim papirjem.

Alternativno namesto lizocima dodamo 50 μ l 40-400 $\mu\text{g ml}^{-1}$ proteinaze K v pufru (20 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl_2 , pH 7,4) na vsako vdolbinico in inkubiramo 30 minut pri 37°C .

- 5.2.2 Dehidriramo celice v stopenjski seriji 50 %, 80 % in 96 % etanola, v vsakem po eno minuto. Objektne stekelce posušimo v stojalu za stekelca.
- 5.2.3 Pripravimo vlažno inkubacijsko komoro, tako da pokrijemo dno hermetične posode z pivnim ali filtrirnim papirjem, prepojenim z 1x hybmix. (Dodatek 7). Predinkubiramo posodo v hibridizacijski pečici vsaj 10 minut pri 55°C .
- 5.2.4 Pripravimo hibridizacijsko raztopino (Dodatek 7), pri čemer naneseemo 45 μ l na objektne stekelce in predinkubiramo 5 minut pri 55°C .
- 5.2.5 Položimo objektne stekelce na vročo ploščo pri 45°C in naneseemo 10 μ l hibridizacijske raztopine na vse štiri vdolbinice na objektnem stekelcu ali stekelcih.
- 5.2.6 Naneseemo 2 krovni stekelci (24 \times 24 mm) na vsako objektno stekelce in pazimo, da se ne napravijo zračni mehurčki. Objektne stekelce položimo v prej ogreto vlažno komoro in čez noč v temi hibridiziramo v pečici pri 55°C .
- 5.2.7 Pripravimo 3 čaše, ki vsebujejo 1 l ultra čiste vode (UPW), 1 l 1x hybmixa (334 ml 3x hybmixa in 666 ml UPW) in 1 l 1/2x hybmixa (167 ml 3x hybmixa in 833 ml UPW). Vsako predinkubiramo v vodni kopeli pri 55°C .
- 5.2.8 Odstranimo krovna stekelca z objektnih stekelc in namestimo objektne stekelce v stojalo za stekelca.
- 5.2.9 Izperemo odvečno sondo z inkubiranjem v čaši z 1x hybmixom pri 55°C 15 minut.

- 5.2.10 Prenesemo stojalo za stekelca v pralno raztopino 1/2 hybmix in inkubiramo nadaljnjih 15 minut.
- 5.2.11 Objektna stekelca na hitro pomočimo v UPW in jih položimo na filtrirni papir. Odstranimo odvečno vlago, tako da površino nalahno prekrijemo s filtrirnim papirjem. S pipeto kanemo 5 do 10 μ l prekrivne raztopine proti bledenju (npr. Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA ali enakovredni) na vsako okence in položimo široko krovno stekelce (24 \times 60 mm) čez celo objektno stekelce.
- 5.3 **Branje testa FISH**
- 5.3.1 Nemudoma pregledamo objektna stekelca pod mikroskopom, opremljenim z virom epifluorescentne svetlobe, pri povečavi 630 ali 1 000x v imerzijskem olju. S filtrom, primernim za fluorescein izotiocinat (FITC), se evbakterijske celice (vključno z večino gram negativnih celic) v vzorcu obarvajo fluorescentno zeleno. Z uporabo filtra za tetrametilrodamin-5-izotiocinat, izgledajo celice *C. m. subsp. sepedonicus*, obarvane s Cy3, fluorescentno rdeče. Primerjamo morfologijo celic s tistimi iz pozitivnih kontrol. Celice morajo biti svetlo fluorescentne in popolnoma obarvane. V primeru odstopanja pri obarvanju se mora ponoviti test FISH (oddelek 9.4). Okenca pregledamo po črtah dveh pravokotnih premerov in po obodu. Pri vzorcih, ki nimajo ali imajo majhno število celic, pregledamo vsaj 40 mikroskopskih polj.
- 5.3.2 Iščemo svetlo fluorescentne celice z značilno morfologijo *C. m. subsp. sepedonicus* v testnih okencih testnih objekt-nih stekelc (glej spletno stran <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Intenzivnost fluorescence mora biti enaka ali večja kot pri sevu pozitivne kontrole. Celice, ki niso popolnoma obarvane, ali s šibko fluorescenco se ne upoštevajo.
- 5.3.3 Če se sumi na okužbo, se test ponovi. To se lahko zgodi v primeru, ko vsa objektna stekelca v seriji kažejo pozitivne celice zaradi okužbe pufra ali če odkrijemo pozitivne celice (zunaj okenca objektne stekelca) na zgornji plasti objektne stekelca.
- 5.3.4 S specifičnostjo testa FISH je povezanih nekaj težav. V peletah jedra stolona in delov stebel krompirja se lahko pojavijo populacije fluorescentnih celic ozadja z neznačilno morfologijo in navzkrižno reagirajoče saprofitske bakterije, podobne velikosti in morfologije kot *C. m. sepedonicus*, čeprav veliko manj pogosto kot pri testu IF.
- 5.3.5 Upoštevamo samo fluorescentne celice značilne velikosti in morfologije, glej 5.3.2.
- 5.3.6 Interpretacija rezultatov testa FISH:
- Veljavne rezultate testa FISH dobimo, če z uporabo filtra FITC opazimo svetlo zeleno fluorescentne celice, velikosti in morfologije značilne za *C. m. subsp. sepedonicus*, in svetlo rdeče fluorescentne celice z uporabo filtra rodamin, pri vseh pozitivnih kontrolah in pri nobeni od negativnih kontrol. Če najdemo svetlo fluorescentne celice z značilno morfologijo, ocenimo povprečno število značilnih celic na mikroskopsko polje in izračunamo število značilnih celic na ml resuspendirane pelete (Dodatek 4). Vzorci z vsaj 5×10^3 značilnih celic na ml resuspendirane pelete se štejejo za potencialno okužene. Potrebno je nadaljnje testiranje. Vzorci z manj kot 5×10^3 značilnih celic na ml resuspendirane pelete se štejejo za negativne.
 - Test FISH je negativen, če z uporabo filtra rodamin ne opazimo svetlo rdeče fluorescentnih celic, velikosti in morfologije značilne za *C. m. subsp. sepedonicus*, če z uporabo filtra rodamin opazimo značilne svetlo rdeče fluorescentne celice pri preparatih pozitivnih kontrol.
6. TEST PCR

Načela

Kadar se uporabi test PCR kot glavni presejalni test in je rezultat pozitiven, se kot obvezni drugi presejalni test opravi test IF. Kadar se test PCR uporabi kot drugi presejalni test in je rezultat pozitiven, je za končno diagnozo potrebno nadaljnje testiranje v skladu z diagramom poteka.

Popolna uporaba te metode kot glavnega presejalnega testa je priporočena samo ob pridobitvi specialističnega strokovnega znanja.

Opomba:

Predhodno testiranje s to metodo mora omogočati ponovljivo odkrivanje vsaj 10^3 do 10^4 celic *C. m. subsp. sepedonicus* na ml dodano ekstraktom vzorcev, ki so bili prej testirani z negativnim rezultatom. Lahko so potrebni optimizacijski poskusi za doseg maksimalnih stopenj občutljivosti in specifičnosti v vseh laboratorijih.

Uporabimo potrjene reagentne in protokole PCR. Raje izberemo metodo z notranjo kontrolo.

Uporabimo ustrezno previdnostne ukrepe, da se ognemo okužbi vzorca s ciljno DNK. Test PCR morajo opravljati izkušeni tehniki v namenskih laboratorijih za molekularno biologijo, da bi čim bolj zmanjšali možnost okužbe s ciljno DNK.

Negativne kontrole (za ekstrakcijo DNK in postopke PCR) morajo biti vedno obravnavane kot končni vzorci v postopku, da je očitno, ali se je zgodil kak prenos DNK.

V test PCR se morajo vključiti naslednje negativne kontrole:

- Ekstrakt vzorca, ki je prej testiran z negativnim rezultatom na *C. m. subsp. Sepedonicus*.
- Kontrole pufrov, ki se uporabljajo za ekstrakcijo bakterije in DNK iz vzorca.
- Reakcijska zmes PCR.

Morajo se vključiti naslednje pozitivne kontrole:

- Alikvoti resuspendiranih pelet, ki jim je bila dodana *C. m. subsp. sepedonicus* (za pripravo glej Dodatek 2).
- Suspenzija 10^6 celic na ml *C. m. subsp. sepedonicus* v vodi iz virulentnega izolata (npr. NCPPB 2140 ali NCPPB 4053).
- Po možnosti se uporabi tudi DNKA, izvlečen iz pozitivnih kontrolnih vzorcev v testu PCR.

Da se ognemo potencialni okužbi, pripravimo pozitivne kontrole v okolju, ločenem od vzorcev, ki jih nameravamo testirati.

Na ekstraktih vzorca mora biti čim manj zemlje. Zato bi bilo v nekaterih primerih priporočljivo pripraviti ekstrakte iz umitih krompirjev, če se uporabijo protokoli PCR.

6.1 Metode prečiščevanja DNK

Uporabimo vzorce pozitivne in negativne kontrole, kot je opisano zgoraj.

Kontrolni material pripravimo na enak način kot vzorec ali vzorce.

Na voljo je več metod prečiščevanja ciljne DNK iz kompleksnih substratov vzorca, pri čimer se odstrani inhibitorje PCR in druge encimske reakcije in v ekstraktu vzorca skoncentrira ciljna DNK.

Naslednja metoda je bila optimizirana za uporabo s potrjeno metodo PCR, prikazano v Dodatku 6.

6.1(a) Pastrova metoda (2000):

1. S pipeto kanemo 220 μ l lizirnega pufru (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) v 1,5 ml Eppendorfovo epruveto.
2. Dodamo 100 μ l ekstrakta vzorca in položimo na grelno površino ali v vodno kopel pri 95 °C za 10 minut.
3. Za 5 minut položimo epruveto na led.
4. Dodamo 80 μ l osnovne raztopine lizocima (50 mg lizocima na ml v 10 mM Tris HCl, pH 8,0) in 30 minut inkubiramo pri 37 °C.
5. Dodamo 220 μ l Easy DNA[®] raztopine A (Invitrogen), dobro premešamo z vrtinčenjem in 30 minut inkubiramo pri 65 °C.

6. Dodamo 100 µl Easy DNA[®] raztopine B (Invitrogen), močno premešamo z vrtnčenjem, da oborina prosto plava v epruveti in je vzorec enotno viskozen.
7. Dodamo 500 µl kloroforma in premešamo z vrtnčenjem, dokler se viskoznost ne zmanjša in zmes ne postane homogena.
8. 20 minut centrifugiramo pri 15 000 g pri 4 °C, da ločimo faze in oblikujemo interfazo.
9. Zgornjo fazo prenesemo v svežo Eppendorfovo epruveto.
10. Dodamo 1 ml 100 % etanola (– 20 °C), na kratko premešamo z vrtnčenjem in 10 minut inkubiramo na ledu.
11. 10 minut centrifugiramo pri 15 000 g pri 4 °C in odstranimo etanol iz pelete.
12. Dodamo 500 µl 80 % etanola (– 20 °C) in premešamo tako, da obračamo epruveto.
13. 10 minut centrifugiramo pri 15 000 g pri 4 °C, ohranimo peleta in odstranimo etanol.
14. Pustimo, da se peleta posuši na zraku ali v vakumski centrifugi.
15. Resuspendiramo peleta v 100 µl sterilne UPW in vsaj 20 minut pustimo na sobni temperaturi.
16. Shranimo pri – 20 °C dokler je ne potrebujemo za PCR.
17. S centrifugiranjem odvrtnimo vso belo oborino in uporabimo 5 µl supernatanta, ki vsebuje DNK za PCR.

6.1(b) Druge metode

Druge metode za ekstrakcijo DNK (npr. Qiagen DNeasy Plant Kit) se lahko uporabijo, če so dokazano enako učinkovite pri prečiščevanju DNK iz kontrolnih vzorcev, ki vsebujejo 10^3 do 10^4 patogenih celic na ml.

6.2 PCR

- 6.2.1 Pripravimo testne in kontrolne matrice za PCR v skladu z potrjenim protokolom (Dodatek 6). Pripravimo desetkratno razredčino ekstrakta vzorca DNK (1:10 v UPW).
- 6.2.2 Pripravimo ustrezno reakcijsko zmes PCR v neokuženem okolju v skladu z objavljenim protokolom (Dodatek 6). Potrjeni protokol PCR je multipla reakcija, ki vključuje tudi notranjo kontrolo PCR.
- 6.2.3 Dodamo 5 µl ekstrakta DNK na 25 µl reakcijske zmesi PCR v sterilne epruvete PCR.
- 6.2.4 Vključimo vzorec negativne kontrole, ki vsebuje samo reakcijsko zmes PCR, in dodamo isti vir UPW, kot je bil uporabljen v zmesi PCR pri vzorcu.
- 6.2.5 Namestimo epruvete v isti ciklični termostat, kot je bil uporabljen pri predhodnem testiranju, in zaženemo ustrezno optimiziran program PCR. (Dodatek 6).

6.3 Analiza produkta PCR

- 6.3.1 Odkrijemo pomnožke PCR z elektroforezo v agaroznem gelu. Odljemo vsaj 12 µl pomnožene reakcijske zmesi DNK iz vsakega vzorca, zmešane s 3 µl nanašalnega pufra (Dodatek 6) v 2,0 % (w/v) agarozne gele v tris-acetat-EDTA (TAE) pufri (Dodatek 6) pri 5–8 V na cm. Uporabimo ustrezni označevalec DNK, npr. lestvico 100 bp.
- 6.3.2 Razkrijemo proge DNK z obarvanjem v etidijevem bromidu (0,5 mg na L) 30 do 45 minut, pri čemer se ustrezno zavarujemo pri ravnanju s to mutageno snovjo.
- 6.3.3 Opazujemo obarvani gel pod kratkovalovno UV presvetlitvijo. (npr. $\lambda = 302$ nm) in iščemo pomnožene produkte PCR pričakovane velikosti (Dodatek 6) ter dokumentiramo.

- 6.3.4 Za vse nove ugotovitve/primere preverimo avtentičnost pomnožka PCR, tako da opravimo analizo restrikcije encima na vzorcu preostale pomnožene DNK z inkubacijo pri optimalni temperaturi in času z ustreznim encimom in pufrom (glej Dodatek 6). Odkrijemo raztopljene delce z elektroforezo v agaroznem gelu kot prej in opazujemo značilne vzorce restrikcijskih delcev pod UV presvetlitvijo po obarvanju z etidijevim bromidom in primerjamo z neraztopljeno in raztopljeno pozitivno kontrolo.

Interpretacija rezultatov testa PCR:

Test PCR je negativen, če v zadevnem vzorcu ne opazimo za *C. m. subsp. sepedonicus* značilnega pomnožka PCR pričakovane velikosti, pojavi pa se v vseh pozitivnih kontrolnih vzorcih (v primeru multiple PCR z za rastlino značilnimi začetniki za notranje kontrole: drugi produkt PCR se mora povečati pri zadevnem vzorcu).

Test PCR je pozitiven, če odkrijemo za *C. m. subsp. sepedonicus* značilen pomnožek PCR pričakovane velikosti in vzorca restrikcije (če je potrebno), pod pogojem, da ni pomnožen iz nobenega negativnega kontrolnega vzorca. Zanesljiva potrditev pozitivnega rezultata se lahko pridobi s ponovitvijo testa z drugim nizom začetnikov PCR. (oddelek 9.3).

Opomba:

Inhibicija PCR se lahko pričakuje, če se pričakovani pomnožek pridobi iz vzorca pozitivne kontrole, ki vsebuje *C. m. subsp. sepedonicus* v vodi, vendar so negativni rezultati pridobljeni iz pozitivnih kontrol *C. m. subsp. sepedonicus* v ekstraktih krompirja. V multiplih protokolih PCR z notranjo kontrolo PCR kaže na inhibicijo reakcije, kadar ni pridobljen nobeden od obeh pomnožkov.

Na okužbo se sumi, če je pričakovani pomnožek pridobljen iz ene ali več negativnih kontrol.

7. BIOLOŠKI TEST

Opomba:

Prehodno testiranje s to metodo mora omogočati ponovljivo odkrivanje vsaj 10^3 do 10^4 enot *C. m. subsp. sepedonicus*, ki ustvarjajo kolonije na ml, dodano ekstraktom vzorcev, ki so bili prej testirani z negativnim rezultatom (za pripravo glej Dodatek 2).

Največjo občutljivost pri odkrivanju lahko pričakujemo pri uporabi sveže pripravljenih ekstraktov vzorca in v optimalnih rastnih pogojih. Vendar pa se metoda lahko uspešno uporabi tudi pri ekstraktih, ki so bili shranjeni v glicerolu pri -68 do -86 °C.

Nekatere sorte jajčevca so odlično obogatitveno gojišče za rast *C. m. subsp. sepedonicus* tudi kadar ni simptomov in so prav tako tudi odlični potrditveni gostiteljski test.

Rastni pogoji morajo biti optimalni, tako da se zmanjša nevarnost napačnih negativnih rezultatov teta.

Za podrobnosti o kulturi glej Dodatek 8.

- 7.1 Med jajčevce porazdelimo ves preostali testni alikvot resuspendirane pelete iz oddelka 3.1.6 ali 3.2.5, z uporabo ene od spodnjih metod (7.3 ali 7.4). Uporabimo samo rastline v stadiju olistanosti 2–3 do popolne razvitosti tretjega pravega lista. Da bi zagotovili popolno uporabo resuspendirane pelete, kakor tudi učinkovito inokulacijo, se za spodnje postopke zahteva 15–25 jajčevcev na vzorec.
- 7.2 1 do 2 dni pred inokulacijo ne zalivamo jajčevcev, da se zmanjša turgor.
- 7.3 Inokulacija z zarezo
- 7.3.1 Ko držimo rastlino med dvema prstoma, s pipeto kanemo kapljico (približno 5 do 10 μ l) suspendirane pelete na steblo med kličnima lista in prvim listom.
- 7.3.2 S sterilnim skalpelom diagonalno zarezemo od peletne kapljice naprej, pri čemer je zareza dolga približno 1,0 cm in globoka $2/3$ debeline stebela.
- 7.3.3 Zarezo zapremo s sterilnim vazelinom iz brizgalke.

7.4 Inakulacija z brizgalko

Inakuliramo steblo jajčevca tik nad kličnim listom z uporabo brizgalke, ki ima hipodermično iglo (ne manj kot 23G). Porazdelimo vzorec med jajčevce.

7.5 Za pozitivno kontrolo inokuliramo 5 rastlin z vodno raztopino 10^5 do 10^6 celic na ml znane kulture *C. m. subsp. sepedonicus* in, kadar je mogoče, z naravno okuženim tkivom gomolja (glej Oddelek 4) z isto inokulacijsko metodo (7.3 ali 7.4).

7.6 Za negativno kontrolo inokuliramo 5 rastlin s sterilnim peletnim pufrom z isto inokulacijsko metodo (7.3 ali 7.4).

7.7 Inkubiramo rastline v karantenskih prostorih do 4 tedne pri 18 do 24 °C. Inkubiramo rastline z zadostno svetlobo in visoko vlažnostjo (70–80 %) ter zalivamo, da preprečimo nalaganje vode ali vnenje. Celice *C. m. sepedonicus* umrejo pri temperaturi nad 30 °C, optimalna temperatura pa je 21 °C. Da se izognemo okužbi, inkubiramo rastline pozitivne in negativne kontrole na jasno ločenih klopah v rastlinjaku ali rastnem prostoru ali v primeru omejenega prostora zagotovimo strogo ločitev med obravnavanjem. Če morajo biti rastline za različne vzorce inkubirane tesno skupaj, jih ločimo z ustreznimi zasloni. Pri gnojenju, zalivanju, preverjanju in drugih posegih moramo močno paziti da ne pride do navzkrižne okužbe. Bistvenega pomena je, da v rastlinjaku ali rastnem prostoru ni insektov, saj ti lahko prenesejo bakterije iz vzorca na vzorec.

7.8 Po enem tednu redno preverjamo simptome. Preštujemo število rastlin, ki kažejo simptome. *C. m. subsp. sepedonicus* povzroča vnenje listov jajčevcev, kar se lahko začne kot obrobnata ali medžilna mlahavost. Ovenelo tkivo je lahko sprva temno zeleno ali lisasto, vendar postane blede preden postane nekrotično. Medžilno vnenje ima pogosto masten, razmočen videz. Nekrotično tkivo ima pogosto svetlo rumen rob. Ni nujno, da rastline odmrejo; čim kasneje se simptomi razvijejo, večja je možnost preživetja. Rastline lahko okužbo prebolijo. Mlade rastline so veliko bolj dovzetne za manjše populacije *C. m. subsp. sepedonicus* kot starejše rastline, zato je potrebno uporabiti rastline na ali stadijem olistanosti 3.

Do vnenja lahko pride tudi zaradi populacij drugih bakterij ali gliv v peleti gomoljnega tkiva. Sem so vključene *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *Erwinia chrysanthemi*, *Phoma exigua* var. *foveata*, kakor tudi velike populacije saprofitskih bakterij. Zlasti *Erwinia chrysanthemi* lahko povzroči listne simptome in vnenje, ki so zelo podobni simptomom *C. m. sepedonicus*. Edina razlika je črnenje stebel pri okužbah z *Erwinia chrysanthemi*. Drugo vnenje je moč razlikovati od tistega, ki ga povzroča *C. m. subsp. sepedonicus*, saj celi listi ali cela rastlina hitro venijo. Lahko se pripravi tudi obarvanje po Gramu: s tem testom razločimo med *C. m. subsp. sepedonicus* in *Erwinia* spp.

7.9 Kakor hitro pri jajčevcih opazimo simptome, je treba opraviti ponovno izolacijo, z uporabo delov ovenelega listnega tkiva ali stebelnega tkiva od rastlin (glej 3.1.3 za maceracijo tkiva). Površinsko razkužimo liste in stebela jajčevca, tako da jih obrišemo s 70 % etanolom. Opravimo test IF ali PCR na soku jajčevca in izoliramo na primerno (selektivno) gojišče (glej oddelek 8). Lahko se pripravi tudi obarvanje po Gramu (Dodatek 9). Identificiramo prečiščene kulture domnevne *C. m. subsp. sepedonicus* in potrdimo patogenost (glej oddelek 9 in 10).

7.10 V nekaterih okoliščinah, zlasti kadar rastni pogoji niso optimalni, lahko *C. m. subsp. sepedonicus* obstaja kot latentna okužba v jajčevcih, tudi po izteku inkubacijskega obdobja do 4 tedne. Če se simptomi po 4 tednih ne pojavijo, opravimo test IF/PCR na sestavljenem vzorcu 1 centimetrskih delcev stebela vsake testne rastline, ki se odvzame nad mestom inokulacije. Če je test pozitiven, se mora opraviti ponovna izolacija na primernem (selektivnem) gojišču, po postopku iz oddelka 8. Identificiramo prečiščene kulture domnevne *C. m. subsp. sepedonicus* in potrdimo patogenost (glej oddelek 9 in 10).

Interpretacija rezultatov biološkega testa

Veljavne rezultate biološkega testa pridobimo, če rastline pozitivne kontrole kažejo značilne simptome, če se bakterija lahko ponovno izolira iz teh rastlin in če negativne kontrole ne kažejo nobenih simptomov.

Biološki test je negativen, če testne rastline niso okužene z bakterijo *C. m. subsp. sepedonicus*, pod pogojem da smo v pozitivni kontroli odkrili bakterije *C. m. subsp. sepedonicus*.

Biološki test je pozitiven, če so testne rastline okužene z bakterijo *C. m. subsp. sepedonicus*.

8. IZOLACIJA *C. M. SUBSP. SEPEDONICUS*

Opomba:

Diagnoza se lahko potrdi le, če se *C. sepedonicus* izolira in nato identificira (glej oddelek 9) ter potrdi s patogenim testom (oddelek 10). Čeprav je *C. m. subsp. sepedonicum* zahteven organizem, ga lahko izoliramo iz simptomatičnega tkiva.

Lahko pa ga prerasejo hitro rastoče saprofitske bakterije, zato je izolacija neposredno iz pelete tkiva gomolja ali stebela težka (oddelek 3.1.6 ali 3.2.5). S selektivnim gojiščem in primerno razredčitvijo resuspendiranih pelet iz jedra stolona ali stebela krompirja, je možna neposredna izolacija *C. m. subsp. sepedonicus*.

Izolacijo je treba opraviti na vseh simptomatičnih gomoljih krompirja ali delih stebela in jajčevcih, kjer niso bili opaženi nobeni simptomi, vendar je bil test IF/PCR sestavljenega vzorca pozitiven (glej oddelek 7.10). Kdaj je to potrebno, se maceracija stebel jajčevca izvede kot je opisano v oddelku 3.1.3.

Za pozitivno kontrolo pripravimo desetkratne razredčitve iz suspenzije 10^6 cfu na ml *C. m. subsp. sepedonicus* (npr. NCPPB 4053 ali PD 406). Da se izognemo možnosti okužbe pripravimo pozitivne kontrole popolnoma ločeno od vzorcev, ki se testirajo.

Pri vsakem novo pripravljenem selektivnem gojišču je treba preveriti njegovo primernost za rast patogena, preden se uporabi za testiranje rutinskih vzorcev.

Kontrolni material testiramo na enak način kot vzorec ali vzorce.

8.1 Razmaz na selektivno gojišče

8.1.1 Iz 100 μ l alikvota resuspendirane pelete krompirjevega vzorca ali soka jajčevca naredimo 10 plastne razredčine v peletnem pufru (Dodatek 3).

8.1.2 Izolacija iz nerazredčene krompirjeve pelete navadno ne uspe, zaradi hitre rasti *Cms* in saprofitov. Ker je bakterija navadno prisotna v visokih populacijah v okuženem tkivu, se saprofiti običajno lahko odstranijo z razredčenjem, medtem ko patogen ostane. Zato je priporočljivo razširiti 100 μ l iz vsakega vzorca, 1/100 do 1/10 000 razredčin na gojišče MTNA ali na gojišče NCP-88 (Dodatek 5) (pri uporabi petrijevk s premerom 90 mm – prilagodimo obseg za petrijevke drugih velikosti), z uporabo trosilnikov (hokejske palice) in trosilnih tehnik.

Opomba:

Alternativna možnost je, da raztrosimo prvotni alikvot po 100 μ l krompirjeve pelete na prvo agar ploščo s trosilnikom in potem odstranimo trosilnik na drugo agar ploščo, pri čemer odstranimo vse ostanke s trosilnika; to ponovimo na koncu še pri tretji plošči.

8.1.3 Plošče inkubiramo v temi pri 21 do 23 °C.

8.1.4 Prva preverjanja plošč, vključno z štetjem kolonij podobnih *C. m. subsp. sepedonicus*, v primerjavi s kontrolnimi ploščami, se opravi po treh dneh, z nadaljnjim štetjem po 5, 7, eventualno 10 dneh.

8.2 Čiščenje sumljivih kolonij

Opomba:

Cepljenje kultur kolonij podobnih *C. m. subsp. sepedonicus* se izvaja na gojišču YGM za inokulacijo jajčevca in/ali kasnejšo identifikacijo; to se izvede preden postanejo plošče preveč zaraščene, t.j. najbolje po 3-5 dneh.

8.2.1 Napravimo proge kolonij podobnih *C. m. subsp. sepedonicus* na enem od naslednjih gojišč: (formule so navedene v Dodatku 5):

hranilni agar z dekstrozo (samo za uporabo cepljenja kultur),

agar s kvasom, peptonom in glukozo

agar s kvasnim ekstraktom in mineralnimi solmi.

Do 10 dni inkubiramo pri 21 °C do 24 °C.

C. m. subsp. sepedonicus raste počasi, navadno proizvaja točkaste, kupolaste, kremaste kolonije v 10 dneh. (Za fotografije značilnih kolonij *C. m. subsp. sepedonicus* glej spletno stran: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

8.2.2 Ponovno napravimo proge, da zagotovimo čistost.

Stopnje rasti se izboljšajo s cepljenjem kultur. Značilne kolonije so kremno bele ali slonokoščene barve, občasno rumene, zaokrožene, gladke, privzdignjene, konveksne, sluzaste, s celimi robovi in običajno premera 1 do 3 mm.

Preprosto obarvanje po Gramu (Dodatek 9) lahko pomaga pri izbiri kolonij za nadaljnje testiranje.

8.2.3 Identificiramo domnevne kulture (glej oddelek 9) in opravimo patogeni test (glej oddelek 10).

9. IDENTIFIKACIJA

Identificiramo čiste kulture domnevnih *C. m. subsp. sepedonicus* izolatov z uporabo vsaj dveh od spodaj opredeljenih testov, ki temeljijo na različnih bioloških principih.

Pri vsakem opravljenem testu vključi znane referenčne seve, kjer je to primerno.

9.1 Hranilni in encimski identifikacijski test

Opredelimo naslednje fenotipske lastnosti, ki so univerzalno prisotne ali odsotne v *C. m. subsp. sepedonicus* po metodah Lelliota in Steada (1987), Klementa in ostalih (1990), Schaada (2001), neznanega avtorja (1987).

Vsa gojišča je treba inkubirati pri 21 °C in pregledati po šestih dneh. Če se rast ni pojavila, inkubiramo do 20 dni.

Vsi testi morajo vključevati kontrolo z znano bakterijo *C. m. subsp. sepedonicum*. Pri hranilnih in fizioloških testih je treba uporabiti inokulum iz precepljenih kultur na hranilnem agarju. Morfološke primerjave je treba opraviti na kulturah na hranilnem agarju z dekstrozo.

Testi	Pričakovani rezultati
Oksidacija/Fermentacija (O/F) test	inerten ali šibko oksidativen
Oksidaza	–
Rast pri 37 °C	–
Ureazna aktivnost	–
Hidroliza eskulina	+
Hidroliza škroba	– ali šibka
Rast v 7 % NaCl	–
Proizvodnja indola	–
Katalaza	+
Proizvodnja H ₂ S	–
Uporaba citrata	–
Utekočinjenje želatine	–
Kislina iz glicerola	–
Kislina iz laktoze	– ali šibka
Kislina iz ramnoze	–
Kislina iz salicina	–
Obarvanje po Gramu (Dodatek 9)	+

9.2 Test IF

- (a) Pripravimo suspenzijo približno 10^6 celic na ml v pufru IF (Dodatek 3)
- (b) Pripravimo dvojne serije razredčin primernega antiseruma.
- (c) Uporabi postopek IF (oddelek 4).
- (d) Test IF je pozitiven, če je titer kulture enak titru pozitivne kontrole. A

9.3 Test PCR

- (a) Pripravimo suspenzijo približno 10^6 celic na ml v ultra čisti vodi (UPW).
- (b) Segrejemo 100 μ l celične suspenzije v zaprtih epruvetah v grelni posodi ali vreli vodi pri 100 °C za 4 minute. Po potrebi lahko dodatek sveže pripravljene NaOH končni koncentraciji 0,05 M pomaga celični liziji. Vzorce se potem lahko shranijo pri – 16 do – 24 °C, dokler jih ne rabimo.
- (c) Uporabimo ustrezne postopke PCR za pomnoženje *specifičnih pomnožkov C. m. subsp. sepedonicus* (npr. Pastrik, 2000; glej Dodatek 4; Li in de Boer, 1995; Mills in drugi., 1997; Pastrik in Rainey, 1999; Schaad in drugi, 1999).
- (d) Pozitivna identifikacija *C. m. subsp. sepedonicus* je dosežena, če so pomnožki PCR iste velikosti in imajo isto restrikcijske dolžine delcev poliorfomov kot pozitivni kontrolni sev.

9.4 Test FISH

- (a) Pripravimo suspenzijo približno 10^6 celic na ml v UPW.
- (b) Uporabimo postopek FISH (oddelek 5).
- (c) Pozitiven test FISH je dosežen, če pride do istih reakcij pri kulturi in pozitivnih kontrolah.

9.5 Profiliranje maščobnih kislin (FAP)

- (a) Kulturo vzgajamo 72 ur pri 21 °C (+/- 1°) na triptikaznem sojinem agarju.
- (b) Izvedemo ustrezni postopek FAP (Janse, 1991; Stead, 1992).
- (c) Pozitiven FAP test je dosežen, če je profil domnevne kulture enak profilu pozitivne kontrole. Navzočnost značilnih maščobnih kislin je 15:1 Anteiso A, 15:0 Iso, 15:0 Anteiso, 16:0 Iso, 16:0 in 17:0 Anteiso močno kaže na *C. m. sepedonicus*. Drugi rodovi kot so *Curtobacterium*, *Arthrobacter* in *Micrococcus* imajo prav tako nekatere od teh kislin, vendar je 15:1 Anteiso A redka kislina v bakterijah, pojavlja pa se v vseh *Clavibacter* spp. med 1 in 5 %. Vrednost v *C. m. sepedonicus* je običajno okoli 5 %.

9.6 BOX-PCR

- (a) Pripravimo suspenzijo približno 10^6 celic na ml v UPW.
- (b) Uporabimo test v skladu s postopkom (Smith in drugi., 2001).

10. POTRDITVENI TEST

Test patogenosti se mora opraviti kot končna potrditev diagnoze *C. m. subsp. sepedonicus* in za oceno virulentnosti kultur, identificiranih kot *C. m. subsp. sepedonicus*:

- 10.1 Pripravimo inokulum približno 10^6 celic na ml iz tridnevne kulture izolata, ki se testira in ustrezne seve pozitivne kontrole *C. m. subsp. sepedonicus*.

- 10.2 Inokuliramo 5–10 stebel jajčevca mladih rastlin v listni fazi 3 (oddelek 7.3 ali 7.4).
- 10.3 Inkubiramo pri 18 do 24 °C pri ustrezni svetlobi in visoko relativno vlažnostjo ter ustrezno zalivamo, da preprečimo nalaganje vode ali sušni stres (oddelek 7.7). Pri čistih kulturah se značilno venenje pojavi v 2 tednih, vendar se rastline, ki po tem času ne kažejo simptomov (glej oddelek 7.8) inkubira do 3 tedne, pri temperaturi značilni za rast jajčevcev, vendar ne več kot pri 25 °C (Dodatek 8). Če se po 3 tednih simptomi ne pojavijo, se kultura ne more potrditi kot patogena oblika *C. m. subsp. sepedonicus*.
- 10.4 Izoliramo iz simptomatičnih rastlin, tako da odstranimo del stebra 2 cm nad mesto inokulacije. Zmeljemo in suspendiramo v majhni količini sterilne destilirane vode ali 50 mM fosfatnega pufra (Dodatek 3). Izoliramo iz suspenzije s trošenjem razredčine ali progami na MTNA in YPGA (Dodatek 5), inkubiramo 3-5 dni pri 21 do 23 °C in pregledamo, če nastanejo značilne kolonije bakterije *C. m. subsp. sepedonicus*.

Dodatek 1

Laboratoriji, ki so vključeni v optimizacijo in potrjevanje protokolov

Laboratorij (1)	Kraj	Država
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Dunaj in Linz	Avstrija
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Belgija
Plantedirektoratet	Lyngby	Danska
Central Science Laboratory	York	Anglija
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburgh	Škotska
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	Nemčija
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Nemčija
State Laboratory	Dublin	Irska
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Nizozemska
Norwegian Crop Research Institute, Plant Protection Centre	Aas	Norveška
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lizbona	Portugalska
Nacionalni inštitut za biologijo	Ljubljana	Slovenija
Centro de Diagnóstico de Aldearrubia	Salamanca	Španija

(1) Za stik z znanstveniki: glej spletno stran <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

Dodatek 2

Priprava pozitivnih in negativnih kontrol za presejalne teste na stolonu PCR/IF in FISH

Izdelamo 72-urno kulturo virulentnega seva bakterije *C. m. subsp. sepedonicus* [NCPPB 4053 ali PD 406] na osnovnem gojišču MTNA in suspendiramo v 10 mM fosfatnega pufra, da dobimo gostoto celic približno $1 \text{ do } 2 \times 10^8$ cfu na ml. To običajno dosežemo pri rahlo motni suspenziji, ekvivalentni optični gostoti 0,20 pri 600 nm.

Odstranimo jedra stolonov 200 gomoljev iz sorte z belo kožo, za katero je znano, da je neokužena z *C. m. subsp. sepedonicus*.

Obdelamo jedra stolona kot običajno in resuspendiramo pelete v 10 ml.

Pripravimo 10 sterilnih 1,5 ml mikroeprevet z 900 μl resuspendirane pelete.

Prenesemo 100 μl suspenzije *C. m. subsp. sepedonicus* v prvo mikroepreveto. Vrtinčimo.

Vzpostavimo desetkratne stopnje okužbe z nadaljnjim razredčenjem v naslednjih petih mikroeprevetah.

Šest okuženih mikroeprevet uporabimo za pozitivne kontrole. Štiri neokužene mikroeprevete uporabimo za negativne kontrole. Mikroeprevete ustrezno označimo.

Pripravimo alikvote po 100 μl v sterilnih 1,5 ml mikroeprevetah in tako dobimo 9 ponovitev vsakega kontrolnega vzorca. Shranimo pri -16 do -24 °C do uporabe.

Navzočnost in količina *C. m. subsp. sepedonicus* v kontrolnih vzorcih se najprej potrdi s testom IF.

Za test PCR opravimo ekstrakcijo DNK iz pozitivnih in negativnih kontrolnih vzorcev pri vsaki seriji testnih vzorcev.

Za testa IF in FISH opravimo analizo pozitivnih in negativnih kontrolnih vzorcev pri vsaki seriji testnih vzorcev.

Za teste IF, FISH in PCR mora biti *C. m. subsp. sepedonicus* odkrita v vsaj 10^6 in 10^4 celic/ml pozitivnih kontrol in v nobeni od negativnih kontrol.

Dodatek 3

Pufri za testne postopke

SPLOŠNO: Neodprti sterilizirani pufri se lahko shranjujejo do enega leta.

1. Pufri za postopke ekstrakcije**1.1 Ekstrakcijski pufer (50 mM fosfatni pufer, pH 7,0)**

Ta pufer se uporablja za ekstrakcijo bakterije iz rastlinskih tkiv s homogenizacijo ali tresenjem.

Na ₂ HPO ₄ (brez vode)	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
Destilirana voda	1,00 L

Raztopimo sestavine, preverimo pH in steriliziramo v avtoklavu pri 121 °C 15 min.

Dodatne sestavine so lahko koristne:

	Namen	Količina (na L)
Kosmiči Lubrol	Deflokulant (*)	0,5 g
Protipenilno sredstvo DC silikon	Sredstvo proti penjenju (*)	1,0 ml
Tetranatrijev pirofosfat	Antioksidant	1,0 g
Polivinilpirolidon-40 000 (PVP-40)	Vezava inhibitorjev PCR	50 g

(*) Za uporabo z metodo ekstrakcije s homogenizacijo

1.2 Peletni pufer (10 mM fosfatni pufer, pH 7,2)

Ta pufer se uporablja za resuspendiranje in redčenje ekstraktov jeder stolonov gomoljev krompirja, ki sledi koncentraciji v peletu s centrifugiranjem.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,4 g
Destilirana voda	1,00 L

Raztopimo sestavine, preverimo pH in steriliziramo v avtoklavu pri 121 °C 15 minut.

2. Pufri za test IF**2.1 Pufer IF (10 mM fosfatni pufer s soljo (PBS), pH 7,2)**

Ta pufer se uporablja za redčenje protiteles.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,4 g
NaCl	8,0 g
Destilirana voda	1,0 L

Raztopimo sestavine, preverimo pH in steriliziramo v avtoklavu pri 121 °C 15 minut.

2.2 *Pufer IF-Tween*

Ta pufer se uporablja za spiranje objektivnih stekelc.

Pufri IF dodamo 0,1 % Tweena 20.

2.3 *Glicerol s fosfatnim pufrom, pH 7,6*

Ta pufer se uporablja kot prekrivna tekočina na okencih objektivnih stekelc IF, da se ojači fluorescence.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	3,2 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,15 g
Glicerol	50 ml
Destilirana voda	100 ml

Prekrivne raztopine proti bledenju so v komercialne namene dostopne npr. pri Vectashield® (Vector Laboratories) ali Citifluor® (Leica).

Dodatek 4

Ugotavljanje stopnje okužbe v testih IF in FISH

1. S štejem določimo povprečno število značilnih fluorescentnih celic na polje (c)
2. Izračunamo število značilnih fluorescentnih celic na okence (C)

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

kjer je S = površina okenca na objektivnem stekelcu z več okenci, in
 s = površina polja objektivna

$s = \pi^2/4G^2K^2$ kjer je i = koeficient polja (odvisen od vrste okularja in znaša od 8 do 24),
 K = koeficient tubusa (1 ali 1,25),
 G = povečava objektivna (100x, 40x itd.).

3. Izračunamo število značilnih fluorescentnih celic na ml pelete (N)

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

kjer je y = prostornina resuspendirane pelete na okencu, in
 F = faktor resuspendirane razredčitve pelete.

Dodatek 5

Gojišča za izolacijo in gojenje bakterije *C. m. subsp. sepedonicus*(a) *Splošna rastna gojišča*

Hranilni agar (NA)

Hranilni Agar (Difco)	23,0 g
Destilirana voda	1,0 L

Raztopimo sestavine in steriliziramo v avtoklavu pri 121 °C 15 min.

Hranilni agar z dekstrozo (NDA)

Hranilni agar Difco bacto, ki vsebuje 1 % D(+)-glukoze (monohidrat). Steriliziramo v avtoklavu pri 115 °C 20 minut.

Agar s kvasom, peptonom in glukozo (YPGA)

Kvasni ekstrakt (Difco)	5,0 g
Pepton Bacto (Difco)	5,0 g
D(+)-glukoza (monohidrat)	10,0 g
Agar Bacto (Difco)	15,0 g
Destilirana voda	1,0 L

Raztopimo sestavine in steriliziramo v avtoklavu pri 121 °C 15 min.

Gojišče s kvasnim ekstraktom in mineralnimi solmi (YGM)

Kvasni ekstrakt Bacto (Difco)	2,0 g
D(+)-glukoza (monohidrat)	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
Agar Bacto (Difco)	18 g
Destilirana voda	1,0 L

Raztopimo sestavine in steriliziramo 0,5 litra gojišča v avtoklavu pri 115 °C 20 min.

(b) *Potrjena selektivna rastna gojišča*

Gojišče MTNA

Če ni drugače navedeno, so vse sestavine gojišča iz BDH.

Kvasni ekstrakt (Difco)	2,0 g
Manitol	2,5 g
K ₂ HPO ₄	0,25 g

KH_2PO_4	0,25 g
NaCl	0,05 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,015 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,005 g
Agar (Oxoid št. 1)	16,0 g
Destilirana voda	1,0 L

Raztopimo sestavine, uravnamo pH na 7,2. Po sterilizaciji v avtoklavu (pri 121 °C 15 minut) in ohladitvi na 50 °C, dodamo antibiotike: trimetoprim 0,06 g, nalidiksično kislino 0,002 g, amfotericin B 0,01 g.

Osnovne antibiotične raztopine: trimetoprim (Sigma) in nalidiksična kislina (Sigma) (oboje pri 5 mg/ml) v 96 % metanolu, amfotericin B (Sigma) (1 mg/ml) v dimetilsulfoksidu. Osnovne raztopine so sterilizirane s filtriranjem.

Opomba:

Trajnost osnovnega gojišča je 3 mesece. Ko se dodajo antibiotiki, je trajnost 1 mesec, če se shranjuje v hladilniku.

Gojišče NCP-88

Hranilni agar (Difco)	23 g
Kvasni ekstrakt (Difco)	2 g
D-manitol	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
Destilirana voda	1,0 L

Raztopimo sestavine, uravnamo pH na 7,2. Po sterilizaciji v avtoklavu in ohladitvi na 50 °C, dodamo naslednje antibiotike: Polimiksin B sulfat (Sigma) 0,003 g, nalidiksično kislino (Sigma) 0,008 g, Cikloheksimid (Sigma) 0,2 g.

Raztopimo antibiotike v osnovnih raztopinah: nalidiksično kislino v 0,01 M NaOH, cikloheksimid v 50 % etanolu, polimiksin B sulfat v destilirani vodi. Osnovne raztopine so sterilizirane s filtriranjem.

Opomba:

Trajnost osnovnega gojišča je 3 mesece. Ko se dodajo antibiotiki, je trajnost 1 mesec, če se shranjuje v hladilniku.

Dodatek 6

Potrjeni protokol in potrjeni reagenti PCR**Opomba:**

Predhodno testiranje mora omogočiti ponovljivo odkrivanje vsaj 10^3 do 10^4 celic bakterije *C. m. sepedonicus* na ml ekstrakta vzorca.

Predhodno testiranje prav tako ne sme kazati lažno pozitivnih rezultatov pri naboru izbranih bakterijskih sevov.

1. Multipli protokol PCR z notranjo kontrolo PCR (Pastrik, 2000)

1.1 Začetni oligonukleotidi

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

Pričakovana velikost pomnožkov iz matrice DNK *C. m. subsp. sepedonicus* = 502 bp (niz začetnih oligonukleotidov PSA).

Pričakovana velikost pomnožkov iz 18S rRNA notranje kontrole PCR = 377 bp (niz začetnih oligonukleotidov NS).

1.2 Reakcijska zmes PCR

Reagent	Količina na reakcijo	Končna koncentracija
Sterilna UPW	15,725 µl	
10x pufer PCR ⁽¹⁾ (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1x (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (frakcija V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
Zmes d-nTP (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Začetni oligonukleotid PSA-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Začetni oligonukleotid PSA-R (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Začetni oligonukleotid NS-7-F (10 µM) ⁽²⁾	0,1 µl	0,04 µM
Začetni oligonukleotid NS-8-R (10 µM) ⁽²⁾	0,1 µl	0,04 µM
Taq polimeraza (5U/µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1,0 U
Prostornina vzorca	5,0 µl	
Skupna prostornina:	25,0 µl	

⁽¹⁾ Metode so bile potrjene z uporabo Taq polimeraze v Perkin Elmer (AmpliTaq ali Gold) in Gibco BRL.

⁽²⁾ Koncentracija začetnih oligonukleotidov NS-7 F in NS-8-R je bila optimizirana za ekstrakcijo jeder stolonov krompirja z uporabo metode s homogenizacijo in prečiščevanja DNK po Pastriku (2000) (glej oddelek 6.1.a in 6.2). Ponovna optimizacija koncentracij reagenta bo potrebna, če se uporabi ekstrakcija s tresenjem ali druga metoda izolacije DNK.

1.3 Pogoji reakcije PCR

Izvedemo naslednji program:

1 cikel:	(i)	3 minute pri 95 °C (denaturacija matrice DNK)
10 ciklov:	(ii)	1 minuta pri 95 °C (denaturacija matrice DNK)
	(iii)	1 minuta pri 64 °C (prileganje začetnih oligonukleotidov)
	(iv)	1 minuta pri 72 °C (podaljševanje kopije)

25 ciklov:	(v)	30 sekund pri 95 °C (denaturacija matrice DNK)
	(vi)	30 sekund pri 62 °C (prileganje začetnih oligonukleotidov)
	(vii)	1 minuta pri 72 °C (podaljševanje kopije)
1 cikel:	(viii)	5 minut pri 72 °C (končno podaljševanje)
	(ix)	pustimo pri 4 °C

Opomba:

Ta program je optimiziran za uporabo s cikličnim termostatom MJ Research PTC 200. Z uporabo drugih modelov bo lahko potrebna prilagoditev trajanja stopenj ciklov (ii), (iii) (iv), (v), (vi) in (vii).

1.4 Restriksijska encimska analiza pomnožka

Produkti PCR, pomnoženi iz DNK bakterije *C. m. subsp. sSepedonicus*, proizvedejo značilen polimorfizem dolžin restriksijskih fragmentov z encimom *Bgl II* po inkubaciji pri 37 °C za 30 minut. Restriksijski fragmenti, pridobljeni iz specifičnega fragmenta *C. m. subsp. sepedonicus*, so velikosti 282 bp in 220 bp.

2. Priprava nanašalnega pufru

2.1 Bromfenol modro (10 % osnovna raztopina)

Bromfenol modro	5 g
Destilirana voda (bidest)	50 ml

2.2 Nanašalni pufer

Glicerol (86 %)	3,5 ml
Bromfenol modro (5.1)	300 µl
Destilirana voda (bidest)	6,2 ml

3. 10x Tris acetatni pufer EDTA (TAE), pH 8,0

Tris pufer	48,4 g
Ledocetna kislina	11,42 ml
EDTA (dinatrijeva sol)	3,72 g
Destilirana voda	1,00L

Razredčimo do 1x pred uporabo.

Dostopno tudi v komercialne namene (npr. Invitrogen ali enakovredno).

Dodatek 7

Potrjeni reagenti za test FISH**1. Oligo-sonde**

specifična sonda za *Cms* CMS-CY3-01: 5'- ttg cgg ggc gca cat ctc tgc acg -3'
 Nespecifična evbakterijska sonda EUB-338-FITC: 5'- gct gcc tcc cgt agg agt-3'

2. Fiksirna raztopina

[OPOZORILO! FIKSIRNA RAZTOPINA VSEBUJE PARAFORMALDEHID, KI JE TOKSIEN. NOSITE ROKAVICE IN NE VDIHAVAJTE. PRIPOROČLJIVO JE DELATI V DIGESTORIJU]

- (i) Segrejemo 9 ml vode molekulske stopnje (npr. ultra čiste vode (UPW)) na približno 60 °C in dodamo 0,4 g paraformaldehida. Paraformaldehid se raztopi, ko dodamo 5 kapljic 1N NaOH in pomešamo z magnetnim mešalcem.
- (ii) Uravnamo pH na 7,0 z dodatkom 1 ml 0,1 M fosfatnega pufru (PB; pH 7,0) in 5 kapljic 1N HCl. Preverimo pH z lakmusovim papirjem in po potrebi uravnamo z HCl ali NaOH.

[OPOZORILO! MERILNIKA PH NE UPORABLJAJTE V RAZTOPINAH S PARAFORMALEDEHIDOM]

- (iii) Filtriramo raztopino skozi 0,22 µm membranski filter in skrbimo, da se ne zapraši, ter hranimo pri 4 °C do nadaljnje uporabe.
- (iv) *Opomba:*
 Alternativna fiksirna raztopina: 96 % etanol.

3. 3x Hybmix

NaCl 2.7 M
 Tris-HCl 60 mM (pH 7,4)
 EDTA (sterilizirano s filtriranjem in shranjeno v avtoklavu) 15 mM

Razredčimo po potrebi do 1x.

4. Hibridizacijska raztopina

1x Hybmix

Natrijev dodecil sulfat (SDS) 0,01 %
 Sonda EUB 338 5 ng/µl
 Sonda CMSCY301 5 ng/µl

Pripravimo količine hibridizacijske raztopine v skladu z izračuni v tabeli. Za vsako objektno stekelce (ki vsebuje 2 različna vzorca v ponovitvi) je potrebno 90 µl hibridizacijske raztopine.

Tabela: Predlagane količine za pripravo hibridizacijske zmesi.

	2 objektni stekelci	8 objektnih stekelc
Sterilna UPW	50,1	200,4
3x hybmix	30,0	120,0
1 % SDS	0,9	3,6
Sonda EUB 338 (100 ng/µl)	4,5	18,0
Sonda CMSCY301 (100 ng/µl)	4,5	18,0
Skupna prostornina (µl)	90,0	360,0

NB.: Shranimo vse raztopine, ki vsebujejo na svetlobo občutljive oligo-sonde v temi pri – 20 °C. Zaščitimo pred neposredno sončno svetlobo ali električno razsvetljavo med uporabo.

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

Na ₂ HPO ₄	8,52 g
KH ₂ PO ₄	5,44 g
Destilirana voda	1,00 L

Raztopimo sestavine, preverimo pH in steriliziramo v avtoklavu pri 121 °C 15 minut.

Dodatek 8**Kultura jajčevcev**

Semena jajčevca (*Solanum melongena*) posejemo v pasteriziran kompost za semena. Ko imajo sadike popolnoma razprta klična lista (10 do 14 dni), jih presadimo v pasteriziran kompost za lončnice.

Jajčevce moramo gojiti v rastlinjaku z naslednjimi okoljskimi pogoji:

Dolžina dneva:	14 ur ali naravna dolžina dneva, če je daljša;
Temperatura:	dnevna: 21 do 24 °C,
	nočna: 15 °C.

Dovzetne sorte jajčevcev:	„Black Beauty“,
	„Long Tom“,
	„Rima“,
	„Balsas“

Dobavitelj; glej spletno mesto <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

Dodatek 9

Postopek barvanja po Gramu (Huckerjeva prilagoditev) (Doetsch, 1981) ⁽¹⁾*Raztopina kristal vijoličnega*

2 g kristal vijoličnega raztopimo v 20 ml 95-odstotnega etanola.

0,8 g amonijevega oksalata raztopimo v 80 ml destilirane vode.

Raztopini zmešamo.

Lugolova raztopina

Jod	1 g
Kalijev jodid	2 g
Destilirana voda	300 ml

Trdne snovi skupaj stremo v terilnici. Dodamo jih vodi in mešamo, dokler se ne raztopijo v zaprti posodi.

Raztopina za nasprotno barvanje s safraninom

Založna raztopina:

Safranin O	2,5 g
95 % etanol	100 ml

Zmešamo in shranimo.

Razredčimo v razmerju 1:10, da dobimo delovno raztopino.

Postopek barvanja

1. Pripravimo razmaze, posušimo na zraku in fiksiramo s segrevanjem.
2. Objektna stekelca za 1 minuto zalijemo z raztopino kristal vijoličnega.
3. Na hitro speremo z vodovodno vodo.
4. Za 1 minuto zalijemo z Lugolovo raztopino.
5. Operemo z vodovodno vodo in popivnemo do suhega.
6. Razbarvamo s 95-odstotnim etanolom, ki ga dodajamo po kapljicah, dokler ni razbarvanje popolno, ali vanj za 30 sekund potopimo razmaz in rahlo tresemo.
7. Operemo z vodovodno vodo in popivnemo do suhega.
8. Za 10 sekund zalijemo z raztopino safranina.
9. Operemo z vodovodno vodo in popivnemo do suhega.

Grampozitivne bakterije se obarvajo vijoličasto-modro; gramnegativne bakterije se obarvajo rožnato-rdeče.

(¹) Uporabijo se lahko tudi raztopine, ki so na voljo na trgu, in pripomočki za barvanje.

VIRI

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 11 288 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.

PRILOGA II

1. Za vsak domnevni pojav, pri katerem je bil rezultat presejalnega(-ih) testa(-ov) v skladu z metodami iz Priloge I pozitiven in katerega potrditev ali ovržba bo mogoča šele ob zaključku omenjenih metod, je treba zadržati in primerno konzervirati:

- vse vzorce gomoljev in, kadar je le mogoče, vse vzorce rastlin,
- kateri koli preostali ekstrakt in dodatno pripravljene materiale za presejalni(-e) test(-e), npr. objektna stekelca imunofluorescenčnega testa,

in

- vso ustrezno dokumentacijo,

do zaključka navedenih metod.

Zadržanje gomoljev bo omogočilo testiranje sort po potrebi.

2. Če se potrdi navzočnost organizma, je treba zadržati in primerno konzervirati:

- material, naštet v odstavku 1,

in

- vzorec materiala okuženega jajčevca, ki je bil inokuliran z ekstraktom iz gomoljev ali rastlin,

in

- izolirano kulturo organizma,

dokler ne preteče najmanj en mesec po uradnem obvestilu v skladu s členom 5(2).

—

PRILOGA III

1. Dejavniki, ki jih je treba upoštevati pri določanju obsega verjetne okužbe v skladu s členom 5(1)(b), vključujejo:
 - gomolje ali rastline, pridelane na mestu pridelave, ki je bilo določeno za okuženo v skladu s členom 5(1)(a),
 - mesto(-a) pridelave, kakor koli povezano(-a) s pridelovanjem gomoljev ali rastlin, določenih za okužene v skladu s členom 5(1)(a), vključno s tistimi, za katere so se neposredno ali preko skupnega izvajalca uporabljali ista oprema in prostori,
 - gomolje ali rastline, ki so bili pridelani na mestu(-ih) pridelave iz prejšnje alinee ali so bili na tem mestu(-ih) pridelave navzoči v času, ko so bili na mestih pridelave iz prve alinee navzoči gomolji ali rastline, določene za okužene v skladu s členom 5(1)(a),
 - posestva, ki prevzemajo krompir z zgoraj navedenih mest pridelave,
 - vse stroje, vozila, posode, skladišča ali njihove dele in vse druge predmete, vključno s pakirnim materialom, ki so morda prišli v stik z gomolji ali rastlinami, določenimi za okužene v skladu s členom 5(1)(a),
 - vsi gomolji ali rastline, uskladiščene v ali v stiku s katerimi koli objekti ali predmeti iz prejšnje alinee pred čiščenjem in razkuževanjem teh objektov in predmetov,
 - glede na rezultate testiranja v skladu s členom 6, tiste gomolje ali rastline, sestrsko ali starševsko klonsko sorodne z gomolji ali rastlinami, določenimi za okužene v skladu s členom 5(1)(a), in za katere se kljub morebitnemu negativnemu rezultatu testa na organizem zdi, da so verjetno okuženi zaradi klonske povezave. Lahko se opravi testiranje sort, da se preveri istovetnost okuženih in klonsko sorodnih gomoljev ali rastlin,

in

 - mesto(-a) pridelave gomoljev ali rastlin iz prejšnje alinee.
2. Dejavniki, ki se upoštevajo pri določitvi možnega širjenja v skladu s členom 5(1)(c), vključujejo:
 - bližino drugih mest pridelave, kjer se prideluje krompir ali druge gostiteljske rastline,
 - skupno pridelavo in uporabo zalog semenskega krompirja.
3. Uradno obvestilo iz prvega pododstavka člena 5(2) se poda:
 - takoj, ko laboratorijsko testiranje z uporabo metod iz Priloge I potrdi navzočnost organizma, vsaj:
 - ime sorte partije krompirja,
 - tip (jedilni, semenski itd.) in po potrebi kategorija semenskega krompirja,
 - ko obstaja nevarnost prenosa okužbe iz druge(-ih) države(-av) članice(-ic) ali v drugo(-e) državo(-e) članico(-e), država članica, v kateri je bil pojav potrjen, državi(-am) članici(-am) takoj sporoči potrebne podatke za usklajevanje s členom 5(3), kot so:
 - ime sorte partije krompirja,
 - ime in naslov pošiljatelja in prejemnika,
 - datum dostave partije krompirja,

- velikost dostavljene partije krompirja,
- kopijo rastlinskega potnega lista ali vsaj številko rastlinskega potnega lista, kadar je to primerno, ali kadar je primerno, registracijsko številko pridelovalca ali trgovca in kopijo dobavnice.

Ko so ti podatki zagotovljeni, se takoj obvesti Komisijo.

- Ko so končane vse preiskave, za vsak primer:
 - datum, ko je bila okužba potrjena,
 - kratek opis opravljenih preiskav za opredelitev vira in možnega širjenja okužbe, vključno z obsegom vzetih vzorcev.
 - informacije o opredeljenem(-ih) ali domnevnem(-ih) viru(-ih) okužbe,
 - podrobnosti o obsegu določene okužbe, vključno s številom mest pridelave in številom partij z navedbo sorte in, pri semenskem krompirju, kategorije,
 - podrobnosti o razmejitvi območja, vključno s številom mest pridelave, ki niso bila določena za okužena, vendar so vključena v območje,
 - druge informacije v zvezi s potrjenim(-i) izbruhom(-i), ki jih lahko zahteva Komisija.
-

PRILOGA IV

1. Uradno nadzorovani ukrepi iz člena 7(1) so:

- uporaba za živalsko krmo po toplotni obdelavi tako, da ni nobene nevarnosti, da bi organizem preživel,

ali
- odlaganje na uradno odobrenem mestu ločenega odstranjevanja odpadkov, kjer ni nevarnosti, da bi patogen prišel v okolje kmetijskih zemljišč, npr. s pronicanjem,

ali
- sežig,

ali
- industrijska predelava z neposredno in takojšnjo dostavo v predelovalni obrat z uradno odobrenimi napravami za odstranjevanje odpadkov, za katero je dokazano, da ne predstavlja nobene prepoznavne nevarnosti za širjenje organizma, in sistemom za čiščenje in razkuževanje vsaj vozil, ki odhajajo,

ali
- drugi ukrepi, če je bilo dokazano, da ne predstavljajo nobene prepoznavne nevarnosti za širjenje organizma; o takšnih ukrepih in utemeljitvah zanje se uradno obvestijo Komisija in druge države članice.

Preostali odpadki, povezani in nastali z zgoraj omenjenim, se odlagajo na načine, ki so uradno odobreni, v skladu s Prilogo 5 k tej direktivi.

2. Ustrezna uporaba ali odstranitev gomoljev ali rastlin, določenih za verjetno okužene v skladu s členom 5(1)(b) in navedenih v členu 7(2), pod nadzorom odgovornih uradnih organov zadevnih držav članic, pri čemer se odgovorni uradni organi ustrezno obveščajo, da se zagotovi stalni nadzor, in odgovorni uradni organi države članice, v kateri naj bi se krompir pakiral in pakiral,odobrijo naprave za odstranjevanje odpadkov iz prve in druge alinee, so:

- uporaba kot jedilni krompir za prehrano, pakiran za neposredno dobavo in uporabo brez prepakiranja, na kraju z ustreznimi napravami za odstranjevanje odpadkov. Krompir, namenjen za sajenje, je lahko na istem kraju le, če je ločen, ali po čiščenju in razkuževanju,

ali
- uporaba kot jedilni krompir za industrijsko predelavo, namenjen za neposredno in takojšnjo dostavo v predelovalni obrat, ki mora imeti ustrezne naprave za odstranjevanje odpadkov in sistem za čiščenje in razkuževanje vsaj vozil, ki odhajajo,

ali
- drug način uporabe ali odstranitve, če je dokazano, da ne predstavlja nobene prepoznavne nevarnosti za širjenje organizma in da so to odobrili navedeni odgovorni uradni organi.

3. Ustrezne metode za čiščenje in razkuževanje predmetov iz člena 7(3) so metode, za katere je bilo dokazano, da ne predstavljajo nobene prepoznavne nevarnosti za širjenje organizma, in ki se izvedejo pod nadzorom odgovornih uradnih organov držav članic.

4. Vrsta ukrepov, ki jih izvedejo države članice na razmejenem območju, določenem v skladu s členom 5(1)(c) in navedenem v členu 7(4), vključuje:

4.1 na mestih pridelave, določenih za okužene v skladu s členom 5(1)(a):

- (a) na polju, ki je bilo v skladu s členom 5(1)(a) določeno za okuženo, bodisi
- (i) — v najmanj treh rastnih letih, ki sledijo letu določene okužbe,
- se izvedejo ukrepi za odstranjevanje krompirjevih samosevcev in drugih samoniklih gostiteljskih rastlin organizma,
- in
- se ne sadijo gomolji, rastline ali seme krompirja ali druge samonikle gostiteljske rastline organizma, ali poljščine, pri katerih je bila dokazana nevarnost prenašanja organizma,
- v prvi sezoni pridelave krompirja, ki sledi obdobju iz prejšnje alinee, in pod pogojem, da na polju niso bili najdeni krompirjevi samosevci in druge samonikle gostiteljske rastline organizma med uradnimi preiskavami vsaj dve zaporedni rastni leti pred sajenjem, se dovoli le pridelava jedilnega krompirja in pobrani gomolji se testirajo po postopku iz Priloge I,
- v sezoni pridelovanja krompirja, ki sledi obdobju iz prejšnje alinee, in ob upoštevanju ustreznega kolo-barja, ki v primeru semenskega krompirja obsega najmanj dve leti, se lahko sadi krompir za pridelavo bodisi semenskega bodisi jedilnega krompirja in se izvede uradna raziskava iz člena 2(1); ali
- (ii) — v štirih rastnih letih, ki sledijo letu določene okužbe,
- se izvedejo ukrepi za odstranjevanje krompirjevih samosevcev in drugih samoniklih gostiteljskih rastlin organizma,
- in
- se polje vzdržuje bodisi v prahi bodisi kot trajni pašnik s pogosto nizko košnjo ali intenzivno pašo,
- v prvi sezoni pridelovanja krompirja, ki sledi obdobju iz prejšnje alinee in pod pogojem, da na polju niso bili najdeni krompirjevi samosevci in druge samonikle gostiteljske rastline organizma med uradnimi preiskavami vsaj dve zaporedni rastni leti pred sajenjem, se dovoli pridelava semenskega ali jedilnega krompirja in pobrani gomolji se testirajo po postopku iz Priloge I;
- (b) na drugih poljih na okuženem mestu pridelave če se odgovornim uradnim organom dokaže, da je nevarnost krompirjevih samosevcev in drugih samoniklih gostiteljskih rastlin organizma odpravljena:
- v ravnem letu, ki sledi letu določene okužbe, se ne sadijo gomolji, rastline ali semena krompirja ali druge samonikle gostiteljske rastline organizma, ali
 - se lahko sadi certificirani semenski krompir le za pridelavo jedilnega krompirja,
 - v drugem ravnem letu, ki sledi letu določene okužbe, se sadi le certificirano seme ali semenski krompir, uradno testiran na bolezen obročkaste gnilobe in pridelan pod uradnim nadzorom na mestih pridelave, ki niso navedena v 4.1, za pridelavo bodisi semenskega bodisi jedilnega krompirja,
 - vsaj v tretjem letu, ki sledi določeni okužbi, se sadi le certificirani semenski krompir ali semenski krompir, pridelan pod uradnim nadzorom iz certificiranega semenskega krompirja, za pridelavo bodisi semenskega bodisi jedilnega krompirja,

- v vsakem od rastnih let iz prejšnjih alinej se izvedejo ukrepi za uničenje krompirjev samosevcev in ostalih morebitnih gostiteljskih rastlin, ki so bile najdene na organizmu po naravni poti, in uradno testiranje pobrnega krompirja za vsako krompirjevo polje v skladu s postopkom iz Priloge I;
 - (c) takoj po določitvi okužbe v skladu s členom 5(1)(a) in po prvem naslednjem rastnem letu se vsi stroji in skladiščni prostori na mestu pridelave, ki so vključeni v pridelavo krompirja, ustrezno očistijo in razkužijo z uporabo ustreznih metod, navedenih v točki 3;
 - (d) na enoti zaščitene pridelave pridelka, kjer je mogoče v celoti zamenjati substrat,
 - se ne sadijo gomolji, rastline ali pravo seme, razen če se na pridelovalni enoti izvedejo uradno nadzorovani ukrepi za izkoreninjenje organizma in odstranijo vsi materiali gostiteljskih rastlin, vključno z najmanj celotno zamenjavo ravnega substrata ter očiščenjem in razkužitvijo pridelovalne enote in vse opreme, in če so nato odgovorni uradni organi odobrili pridelavo krompirja,
- in
- se krompir prideluje iz certificiranega semenskega krompirja ali minigomoljev ali mikrorastlin, pridobljenih iz testiranih virov;

4.2 znotraj razmejenega območja in brez poseganja v ukrepe iz točke 4.1, države članice:

- (a) takoj po določeni okužbi zagotovijo čiščenje in razkuževanje vseh strojev in skladiščnih prostorov na takšnih posestvih, vključenih v pridelavo krompirja, kjer je to ustrezno, z uporabo ustreznih metod, navedenih v točki 3;
- (b) takoj in za vsaj tri rastne sezone po ugotovljeni okužbi:
 - zagotovijo nadzor posestev, ki pridelujejo, skladiščijo ali obdelujejo krompir, vključno s posestvi, ki pogodbeno upravljajo s stroji za obdelavo krompirja, preko svojih odgovornih uradnih organov,
 - zahtevajo sajenje le certificiranega semena ali semena, pridelanega pod uradnim nadzorom, za vso pridelavo krompirja znotraj tega območja in testiranje po pravilu semenskega krompirja, pridelanega na mestih pridelave, ki so bila določena za verjetno okužena po členu 5(1)(b),
 - zahtevajo, da se mora na vseh posestvih znotraj tega območja zaloge pospravljenega semenskega krompirja obravnavati ločeno od jedilnega krompirja ali potem zahtevajo, da se izvede čiščenje in razkuževanje med obravnavanjem semenskih in jedilnih zalog,
 - izvajajo uradno raziskavo iz člena 2(1);
- (c) kadar je primerno, izdelajo program za zamenjavo celotnih zalog semenskega krompirja v ustreznem časovnem obdobju.

PRILOGA V

Uradno odobreni načini odstranjevanja odpadkov iz odstavka 1 Priloge IV so v skladu z naslednjimi določbami tako, da ni mogoče prepoznati nevarnosti širjenja organizma:

- (i) krompirjevi odpadki (vključno z izločenim krompirjem in olupki) in drugi trdni odpadki, povezani s krompirjem (vključno z zemljo, kamni in drugimi ostranki) se
- odlagajo na uradno odobrenem mestu ločenega odstranjevanja odpadkov, kjer ni nevarnosti, da bi patogen prišel v okolje kmetijskih zemljišč, npr. s pronicanjem. Odpadki se prepeljejo neposredno na odlagališče v zaprtem sistemu, tako da ni nevarnosti izgube odpadkov,
 - ali
 - sežigajo,
 - ali
 - zanje izvedejo drugi ukrepi pod pogojem, da ni nevarnosti širjenja organizma; take ukrepe je treba sporočiti Komisiji in ostalim državam članicam.
- (ii) odpadne vode: pred odstranitvijo se iz odpadnih vod, ki vsebujejo suspendirane trdne delce, ti delci odstranijo s filtracijo ali postopkom posedanja. Te delce se odstrani v skladu s pododstavkom (i).

Nato se odpadne vode bodisi:

- segreje na najmanj 60 °C celotne prostornine najmanj 30 minut pred odlaganjem,
- ali
- odstrani na drug način, ki je predmet uradne odobritve, in pod uradnim nadzorom tako, da ni nevarnosti, da bi odpadki lahko prišli v stik s kmetijskim zemljiščem. Podrobnosti o tem se sporoči ostalim državam članicam in Komisiji.

Možnosti, opisane v tej prilogi, veljajo tudi za odpadke, povezane z ravnanjem, odlaganjem in obdelavo okuženih partij.