

Na temelju članka 9. stavak (3), članka 10. stavak (5), članka 12. stavak (3), članka 41. stavak (4) i članka 60. stavak (5) Zakona o zaštiti zdravlja bilja ("Službeni glasnik BiH", broj 23/03), Ministarstvo vanjske trgovine i ekonomskih odnosa Bosne i Hercegovine, na prijedlog Uprave Bosne i Hercegovine za zaštitu zdravlja bilja, donosi

PRAVILNIK

O PROVOĐENJU SUSTAVNE KONTROLE I PODUZIMANJU MJERA U CILJU SPRJEČAVANJA UNOŠENJA, ŠIRENJA I KONTROLE PRSTENASTE TRULEŽI GOMOLJA KRUMPIRA KOJU UZROKUJE BAKTERIJA *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* (SMITH) DAVIS *ET AL.* SSP. *SEPEDONICUS* (SPIECKERMANN *ET* KOTTHOFF) DAVIS *ET AL.*

članak 1.

(Predmet)

Ovim Pravilnikom se propisuje način provođenja sustavne kontrole koja se provodi u svrhu utvrđivanja prisustva i određivanja rasprostranjenosti bakterije *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis *et al.* ssp. *sepedonicus* (Spieckermann *et* Kotthoff) Davis *et al.* prouzrokovaca prstenaste truleži gomolja krumpira (u daljnjem tekstu: štetni organizam), sprečavanje pojave i širenja i, ukoliko se utvrdi, sprečavanje širenja i kontrola u cilju iskorjenjivanja, kao i šema testiranja za dijagnosticiranje, detekciju i identifikaciju šetnog organizma.

članak 2.

(Definicije)

Izrazi uporabljeni u Zakonu o zaštiti zdravlja bilja ("Službeni glasnik BiH", broj 23/03), (u daljnjem tekstu: Zakon), uporabljavaju se i u ovom Pravilniku, a specifični izrazi uporabljeni u ovom Pravilniku imaju sljedeće značenje:

- a) **prostorije** - bilo koje zgrade, zemljište, prijevozna sredstva ili drugi objekti koje uprabljava isti proizvođač;
- b) **jedinica zašt}ene proizvodnje usjeva** - odnosi se na rasadnike, staklenike, platenike, plastične tunele i tople lijehe za biljke;
- c) mjesto **proizvodnje** - znači polje ili više polja ili jedinica zašt}ene proizvodnje usjeva koji funkcioniraju kao jedinstvena proizvodna ili poljoprivredna jedinica;
- d) **godina rasta** - znači razdoblje od 12 mjeseci koji počinje kada klimatski uvjeti u izvjesnim oblastima dozvoljavaju početak proizvodnje krumpira;
- e) **sezona proizvodnje** - odnosi se na razdoblje od sadnje biljaka ili gomolja do njihovog skladištenja;
- f) **fitosanitarne službe** - nadležni organi u entitetima i Brčko Distriktu Bosne i Hercegovine;

g) **ovlašteni laboratorij** - laboratorij koji je osposobljen za testiranje ovog štetnog organizma i koji je dobio ovlaštenje sukladno članku 68. stavak (1) Zakona;

h) **stručna ovlaštena osoba** - osoba koja obavlja poslove po ovlaštenju iz članka 68. stavak (6) Zakona.

članak 3.

(Sustavna kontrola)

(1) Uprava Bosne i Hercegovine za zaštitu zdravlja bilja (u daljnjem tekstu: Uprava), u suradnji s nadležnim organima entiteta i Brčko Distrikta Bosne i Hercegovine, propisuje godišnji program sustavne kontrole za potvrđivanje odsustva ili prisustva štetnog organizama na temelju jasnih znanstvenih i statističkih principa i biologije štetnog organizma.

(2) Ove sustavne kontrole vrše fitosanitarne inspekcije entiteta i Brčko Distrikta Bosne i Hercegovine i ovlašteni laboratoriji.

članak 4.

(Način vršenja sustavne kontrole)

(1) Prisustvo štetnog organizma se utvrđuje provjerom gomolja krumpira (u daljnjem tekstu: gomolji), i gdje je to primjenjivo, biljki krumpira (*Solanum tuberosum* L.) (u daljnjem tekstu: biljke).

(2) Pri pregledu gomolja fitosanitarni inspektor uzima uzorke sjemenskog krumpira i krumpira koji nije namijenjen sadnji (u daljnjem tekstu: merkantilni krumpir), prvotno iz partija koje se nalaze u skladištima, i dostavlja ih u ovlašteni laboratorij radi testiranja. U slučaju potrebe fitosanitarni inspektor može uzeti i dodatne uzorke gomolja kako bi obavio vizualni pregled prerezanih gomolja.

(3) Za ovaj pregled, u slučaju kontrole biljaka, fitosanitarni inspektor uzima uzorke gomolja ili biljaka i šalje ih u ovlašteni laboratorij radi testiranja.

(4) Laboratorijsko testiranje iz st. (2) i (3) ovog članka provodi se sukladno s postupkom iz Pravitka II koji je sastavni dio ovog Pravilnika, (u daljnjem tekstu: propisani postupak).

(5) Broj, podrijetlo, dinamika i vrijeme uzimanja uzoraka se utvrđuje godišnjim programom koji je propisan u članku 3. stavak (1) ovoga Pravilnika.

(6) Godišnjim programom sustavne kontrole određuje se financiranje, na razini entiteta i Brčko Distrikta Bosne i Hercegovine, kao i državnoj razini, laboratorijskih uzoraka po zahtjevu fitosanitarnih inspektora bilo da su nalazi pozitivni ili negativni.

(7) Uprava, u suradnji s nadležnim organima entiteta i Brčko Distrikta Bosne i Hercegovine, propisuje uvjete glede opremljenosti i osposobljenosti za testiranje ovog štetnog organizma i izdaje ovlaštenja.

članak 5.

(Izvještavanje u slučaju zaraze ili sumnje na zarazu)

Ukoliko vlasnik ili bilo koja osoba koja posumnja na prisustvo štetnog organizma na krumpiru koji raste ili koji je izvađen, uskladišten ili se nalazi u prodaji, obvezna je bez odlaganja izvijestiti nadležnog fitosanitarnog inspektora.

članak 6.

(Postupanje sa uzorcima)

(1) Tijekom izvođenja godišnjeg sustavnog nadzora i u slučaju sumnje na prisustvo štetnog organizma, fitosanitarni inspektor uzima uzorke gomolja ili biljaka i šalje ih u ovlaštenu laboratoriju na testiranje.

(2) U slučaju sumnje na prisustvo štetnog organizma, sve količine ili pošiljke iz kojih su uzeti uzorci ostaju pod kontrolom fitosanitarnog inspektora. Ukoliko se radi o uvoznjoj pošiljci primjenjuju se odredbe Pravilnika o mjerama za sprječavanje unošenja, širenja i suzbijanja štetnih organizama na bilju, biljnim proizvodima i reguliranim objektima sve dok se ne saznaju rezultati imunofluorescentnog testa, kao dijela propisanog postupka ili drugih odgovarajućih testiranja.

(3) U slučaju sumnje na postojanje štetnog organizma za koji je identificiran pozitivan imunofluorescentni test, ovlaštena laboratorija zadržava i prikladno konzervira krumpir, dok se ne završi laboratorijsko testiranje za:

- a) sve gomolje ili biljke koje su uzete kao uzorci;
- b) sve preostale ekstrakte i dodatno pripremljene imunofluorescentne slajdove ili bilo koji drugi relevantni materijal biljke koji je korišten u laboratorijskim testiranjima.

članak 7.

(Sumnja na zarazu)

(1) Na zarazu štetnim organizmom sumnja se:

- a) ako su uočeni simptomi bolesti ili;
- b) ako je rezultat imunofluorescentnog ili nekog drugog brzog testa provjere sukladan s propisanim postupkom pozitivan.

(2) Da bi se potvrdila ili opovrgnula sumnja na zarazu štetnim organizmom, fitosanitarni inspektor odmah uzima uzorak i dostavlja ga ovlaštenom laboratoriju.

(3) Do dobivanja konačnih rezultata laboratorijskog testiranja iz stavka (2) ovog članka fitosanitarni inspektor rješenjem naređuje slijedeće mjere:

a) zabranjuje prijevoz/prijenos i promet biljaka svih proizvoda, količina ili pošiljki odakle su uzeti uzorci. U slučaju uvozne pošiljke primjenjuju se odredbe Pravilnika o mjerama za sprječavanje unošenja, širenja i suzbijanja štetnih organizama na bilju, biljnim proizvodima i reguliranim objektima;

b) određuje druge mjere koje je propisala Uprava u cilju utvrđivanja podrijetla sumnjive pojave;

c) određuje odgovarajuće dodatne preventivne mjere koje je propisala Uprava, na temelju razina procijenjenog rizika, u cilju sprječavanja širenja štetnog organizma. Ove mjere mogu obuhvatiti zvaničnu kontrolu i ograničenja prenošenja svih ostalih gomolja krumpira ili biljaka unutar ili izvan mjesta koja su povezana sa sumnjivom pojavom.

članak 8.

(čuvanje dokaznog materijala)

U slučaju sumnje na pojavu štetnog organizma, do dobivanja konačnog rezultata laboratorijskog testiranja provedenog sukladno s propisanim postupkom, ovlašteni laboratorij obavezan je zadržati i na primjeren način čuvati:

a) sve uzorkovane gomolje i, kada je to moguće, sve uzorkovane biljke;

b) sav preostali ekstrakt i dodatno pripremljen materijal za brze testove provjere, npr. stakalca za imunofluorescenciju i;

c) svu pripadajuću dokumentaciju.

članak 9.

(Postupak u slučaju potvrđene zaraze)

(1) Ako se prilikom zvaničnog laboratorijskog testiranja iz članka 4. stavak (4) ovog Pravilnika, u uzorku gomolja, biljaka ili dijelova biljaka potvrdi prisustvo štetnog organizma, Uprava, u suradnji sa fitosanitarnim službama ima obvezu da:

a) označi kao zaražene gomolje ili biljke, pošiljke ili partije, strojeve, prijevozna sredstva, skladišta ili njegove dijelove ili bilo koje druge objekte i predmete uključujući materijale za pakiranje iz kojih je uzet uzorak, kao i, gdje je to praktično, mjesta proizvodnje i polja s kojih su gomolje ili biljke izvađene;

b) odredi obujam moguće zaraze;

c) odredi obujam potvrđene zaraze i;

d) odredi područje mogućeg širenja štetnog organizma.

(2) Na temelju obujma potvrđene zaraze, obujma moguće zaraze i područja mogućeg širenja organizma, Uprava, u suradnji sa fitosanitarnom službom, po

Žurnom postupku određuje posebice regulirano područje u kojem se provode mjere propisane ovim Pravilnikom.

članak 10.

(Obujam mogu}e zaraze)

Uprava, u suradnji s fitosanitarnim službama, na temelju podataka utemeljenih na znanstvenim principima i biologiji štetnog organizma, kao i podataka o sustavu proizvodnje, marketinga i prerade, utvrđuje obujam mogu}e zaraze, na temelju informacija o mogućem kontaktu gomolja s utvrđenom zarazom prije i poslije njihovog vađenja ili tijekom njihove proizvodnje, uzimaju}i u obzir:

a) gomolje ili biljke koji su rasle na mjestu proizvodnje koje je označeno kao zaraženo;

b) mjesto(a) proizvodnje ili prostorije koje imaju neku vezu s proizvodnjom gomolja ili biljaka koje su označene kao zaražene, uključuju}i i ona koja dijele proizvodnu opremu i/ili uređaje, bilo kakve strojeve, prijevozna sredstva, posude, skladišta ili njihove jedinice, ili bilo koje druge objekte uključuju}i materijal za pakiranje;

c) gomolje ili biljke proizvedene na mjestu(ima) navedenim u točki b) ovog članka, ili su se nalazili na tim mjestu(ima) proizvodnje u vrijeme dok su gomolje ili biljke koje su označene kao zaražene bile prisutne u prostorijama ili na mjestima proizvodnje navedenim u točki a) ovog članka;

d) centralna skladišta u kojima se skladišti ili doraduje krumpir s mjesta proizvodnje navedenim u toč. a), b) i c) ovog članka;

e) bilo koji stroj, prijevozno sredstvo, posudu, skladište ili njihove jedinice i bilo koje objekte, uključuju}i materijal za pakiranje, koji su mogli do}i u dodir sa gomoljima ili biljkama koje su označene kao zaražene, tijekom prethodnog razdoblja od 12 mjeseci ili koliko je to potrebno;

f) sve gomolje ili biljke koje su bile uskladištene ili u kontaktu s nekim od objekata ili predmeta iz točke e) ovog članka, prije čiš}enja i dezinfekcije tih objekata i predmeta;

g) gomolje ili biljke koje se smatraju vjerojatno zaraženima zbog istog klonskog podrijetla s gomoljima ili biljkama koje su označene kao zaražene, iako su rezultati testiranja provedeni sukladno s propisanim postupkom negativni. Kada je potrebno, može se provesti i test sortnosti da bi se provjerio identitet zaraženih i klonski srodnih gomolja ili biljaka krumpira i;

h) mjesta proizvodnje gomolja ili biljaka iz točke g) ovog članka.

članak 11.

(Testiranje klonski srodnog krumpira)

(1) Partije krumpira koje su istog klonskog podrijetla s gomoljima ili biljkama koje su označene kao zaražene sukladno s člankom 4. stavak (4)

ovog Pravilnika, podliježu obveznom laboratorijskom testiranju sukladno s propisanim postupkom.

(2) Fitosanitarni inspektor na temelju podataka dobivenih od Uprave određuje testiranje onolikog broja uzoraka gomolja ili biljaka koliko je potrebno da bi se odredio mogući primarni izvor zaraze i obujam moguće zaraze, pri čemu redoslijed testiranja ovisi od stupnja opasnosti.

(3) Nakon dobivanja rezultata laboratorijskog testiranja iz stavka (1) ovog članka, Uprava, u suradnji sa fitosanitarnom službom, provodi dalje utvrđivanje obujma potvrđene zaraze i obujma moguće zaraze, te posebice reguliranog područja. Fitosanitarni inspektor obilježava posebice regulirano područje.

članak 12.

(Mjere i postupci s zaraženim krumpirom)

(1) Sadnja gomolja koje su označene kao zaražene sukladno s člankom 9. stavak (1) ovog Pravilnika nije dopuštena, već se one kao i zaražene biljke moraju, pod nadzorom fitosanitarnog inspektora:

- a) uništiti ili;
- b) uporabiti kao hrana za životinje nakon odgovarajuće termičke obrade koja ne ostavlja nikakvu mogućnost preživljavanja štetnog organizma ili;
- c) odložiti na službeno odobrenom mjestu za zbrinjavanje otpada, za koje je utvrđeno da ne postoji opasnost od nekontroliranog širenja štetnog organizma u okoliš, na primjer cijedenjem kroz pore tla do poljoprivrednog zemljišta ili;
- d) spaliti ili;
- e) industrijski preraditi, pod uvjetom da se izravno i odmah dopreme do mjesta prerade, na kojem mora postojati službeno odobrena oprema za zbrinjavanje otpada, čijim je korištenjem otklonjena opasnost od širenja štetnog organizma, i na kojemu postoji sustav za čišćenje i dezinfekciju barem onih prijevoznih sredstava koja napuštaju mjesto prerade ili;
- f) podvrgnuti drugim mjerama, pod uvjetom da nema opasnosti od širenja štetnog organizma.

(2) Sav preostali otpad koji je nastao kao rezultat provedbe mjera iz stavka (1) ovog članka, mora biti zbrinut sukladno sa službeno odobrenim postupkom sukladno s člankom 13. ovog Pravilnika.

članak 13.

(Mjere i postupci s mogućim zaraženim krumpirom)

(1) Gomolje ili biljke označene kao moguće zaražene štetnim organizmom sukladno s člankom 7. ovog Pravilnika se ne smiju saditi, nego se pod kontrolom fitosanitarnog inspektora moraju:

a) koristiti kao merkantilni krumpir namijenjen za potrošnju, pri čemu mora biti pakiran na mjestima koja raspolažu odgovarajućom opremom za zbrinjavanje otpada, na način da je spreman za neposrednu dostavu i uporabu bez naknadnog prepakiranja. Sa sjemenskim krumpirom dozvoljeno je rukovati na tim istim mjestima samo ako se radi odvojeno ili nakon čišćenja i dezinfekcije ili;

b) koristiti kao merkantilni krumpir namijenjen za industrijsku preradu, uz izravnu i brzu dostavu do pogona za preradu, koji mora raspolagati odgovarajućom opremom za zbrinjavanje otpada i opremom za čišćenje i dezinfekciju barem onih prijevoznih sredstava koja napuštaju mjesto prerade ili;

c) koristiti u druge svrhe ili raspolagati na neki drugi službeno odobren način, pod uvjetom da nema opasnosti od širenja štetnog organizma.

(2) Mjere navedene u stavku (1) ovog članka se također primjenjuju na gomolje istog klonskog podrijetla i biljke, bez obzira na rezultate testiranja, navedene u članku 11. ovog Pravilnika.

članak 14.

(čišćenje i dezinfekcija)

(1) Fitosanitarni inspektor donosi rješenje kojim se naređuje da se svaki stroj, prijevozno sredstvo, posuda, skladište ili njihove jedinice ili bilo koji drugi objekti označeni kao zaraženi sukladno s člankom 8. ovog Pravilnika moraju ili uništiti ili očistiti i dezinficirati primjenom odgovarajućih postupaka kojima se otklanja opasnost od širenja štetnog organizma.

(2) Nakon izvršene dezinfekcije, objekti i predmeti iz stavka (1) ovoga članka više se ne smatraju zaraženima.

članak 15.

(Postupci zbrinjavanja otpada)

(1) Službeno odobreni postupak zbrinjavanja otpada nastalog u procesu industrijske prerade iz članka 13. ovog Pravilnika mora se izvršiti tako da se izbjegne svaka opasnost od širenja štetnog organizma:

a) otpaci krumpira (uključujući odbačeni krumpir i koru) i svi drugi kruti otpaci koji su u svezi s krumpirom (uključujući zemlju, kamenje i druge ostatke) moraju se odstraniti na slijedeći način:

1) odložiti na za to službeno odobrenom mjestu, na kojem ne postoji opasnost od nekontroliranog širenja štetnog organizma u okolišu, na primjer cijedenjem kroz pore do poljoprivrednog zemljišta. Otpaci se prevoze izravno do određenog mjesta u zatvorenom prijevoznom sredstvu tako da ne postoji opasnost od gubitka otpada ili;

2) spaliti ili;

3) primijeniti neke druge mjere za koje je utvrđeno da ne postoji opasnost od širenja štetnog organizma.

b) tekući otpad nastao u preradi, a koji sadrži raspršene krute čestice, mora se prije uklanjanja filtrirati ili obraditi postupkom sedimentacije radi odstranjivanja krutih čestica. Krute čestice se nakon toga uklanjaju na način naveden u točki a) ovog stavka. Tekući dio otpada se mora:

1) u cijelosti prije odstranjivanja zagrijati na temperaturu od najmanje 60°C u trajanju od najmanje 30 minuta ili;

2) odstraniti pod službenim nadzorom na neki drugi službeno odobren način koji onemogućava da otpaci dođu na bilo koji način u dodir s poljoprivrednim zemljištem.

(2) Postupci propisani u stavku (1) ovog članka primjenjuju se i na otpad koji nastaje tijekom rukovanja, odstranjivanja i prerade zaraženih partija.

članak 16.

(Mjere u posebice reguliranom području)

U posebice reguliranom području određenom sukladno članku 9. stavak (2) ovog Pravilnika, fitosanitarni inspektor naređuje provođenje mjera navedenih u Pravitku I koji je sastavni dio ovog Pravilnika.

članak 17.

(Postupak sa sjemenskim krumpirom)

(1) Sjemenski krumpir mora poticati izravno od materijala dobivenog prema zvanično odobrenom programu kontrole i za koji službenim laboratorijskim testiranjem provedenim sukladno s propisanim postupkom utvrđeno da nije zaražen štetnim organizmom.

(2) Gore pomenuta testiranja se obavljaju:

a) u slučajevima u kojima zaraza ugrožava proizvodnju sjemenskog krumpira, na biljkama iz početne faze klonske selekcije;

b) u ostalim slučajevima, ili na biljkama iz početne faze klonske selekcije, ili na reprezentativnim uzorcima osnovnog sjemena krumpira, odnosno ranijih generacija u lancu vegetativnog razmnožavanja.

članak 18.

(Zabrana posjedovanja i korištenja štetnog organizma)

Zabranjeno je posjedovanje i bilo kakvo korištenje štetnog organizma.

članak 19.

(Iznimke od propisanih mjera)

Uprava je dozvoliti iznimke glede provođenja mjera propisanih čl. 12., 13., 14., 16. i 18. ovog Pravilnika u eksperimentalne, znanstvene svrhe ili selekcijski rad, pod uvjetom da se tim osigura nadzor nad štetnim organizmom i da nema opasnosti od njegovog širenja.

članak 20.

(Vođenje evidencije)

Uprava vodi evidenciju koja uključuje dokumentirane dokaze o obujmu potvrđene zaraze, obujmu moguće zaraze i o području mogućeg širenja, sa slijedećim informacijama:

- a) nadnevak kada je zaraza potvrđena;
- b) opis elemenata koji su doveli do odluke da se proglasi zaraza i područje mogućeg širenja štetnog organizma, uključujući i podatke o uzimanju uzoraka i o laboratorijskom nalazu;
- c) za bilo koju količinu ili pošiljku krumpira označenu kao zaraženu, podatke o fitosanitarnom certifikatu, uvjerenje o zdravstvenom stanju u slučaju domaće proizvodnje krumpira, i kada je moguće podatke o biljnoj putovnici, registarskom broju proizvođača, zbirnim skladištima i dispečerskim centrima;
- d) informacije o identificiranim ili mogućim izvorima zaraze;
- e) pojedinosti o obujmu označene zaraze, uključujući broj mjesta proizvodnje i broj partija s nazivom sorte, a kada se radi o sjemenskom krumpiru, i o njegovoj kategoriji;
- f) pojedinosti o posebice reguliranom području, uključujući broj mjesta proizvodnje koja nisu označena kao zaražena, ali su uključena u posebice regulirano područje.

članak 21.

(Dodatne i strožije mjere)

- (1) Uprava može propisati dodatne ili strožije mjere koje su potrebite u cilju borbe protiv štetnog organizma ili sprječavanja njegovog širenja.
- (2) Dodatne mjere iz stavka (1) ovog članka mogu uključivati i zahtjev da se sadi samo onaj sjemenski krumpir koji ima zvanični certifikat.
- (3) U slučajevima kada proizvođač ima ovlaštenje da koristi na svom vlastitom imanju sjemenski krumpir koji je dobiven iz vlastite proizvodnje, kao i u drugim slučajevima kada se sadi vlastito proizveden sjemenski krumpir, njegova uporaba se dozvoljava samo ukoliko je krumpir zvanično pregledan i ukoliko je utvrđeno da zadovoljava zdravstvene standarde.

članak 22.

(Fitosanitarni inspektor)

Do uspostave fitosanitarnog inspektora posao fitosanitarnog inspektora u Republici Srpskoj obavljaju republički poljoprivredni inspektori, a u Federaciji Bosne i Hercegovine, posao fitosanitarnog inspektora obavljaju poljoprivredni inspektori.

članak 23.

(Stupanje na snagu)

Ovaj Pravilnik stupa na snagu osmog dana od dana objavljivanja u "Službenom glasniku BiH", a primjenjuje se od 1. siječnja 2010. godine.

Broj 07-01-02-7175-2/09
30. rujna 2009. godine
Sarajevo

Ministar
Mladen Zirojević, v. r.

PRILOG

PRIVITAK I

Mjere koje naređuje fitosanitarni inspektor i koje se provode u posebice reguliranom području uspostavljenom sukladno članku 6. stavak (2) ovog Pravilnika su slijedeće:

I. NA MJESTIMA PROIZVODNJE KOJA SU OZNAČENA KAO ZARAŽENA:

1. Na polju koje je označeno kao zaraženo:
 - 1.1.1. u iduće, najmanje tri vegetacijske godine nakon godine u kojoj je utvrđena zaraza:
 - obvezno je uklanjanje samoniklih biljaka krumpira i drugih biljaka domaćina štetnog organizma, i
 - zabranjena je sadnja gomolja i biljaka te sjetva sjemena krumpira u botaničkom smislu kao i sjetva i sadnja drugih biljaka domaćina štetnog organizma ili usjeva za koje je utvrđeno da omogućavaju širenje štetnog organizma,
 - 1.1.2. u prvoj sezoni proizvodnje krumpira koja slijedi nakon razdoblja iz podtočke 1.1.1., pod uvjetom da na polju najmanje dvije uzastopne vegetacijske godine prije sadnje tijekom provođenja sustavnog istraživanja nisu nađene samonikle biljke krumpira i druge biljke domaćini, dopušta se proizvodnja isključivo merkantilnog krumpira, uz testiranje gomolja sukladno propisanom postupku;
 - 1.1.3. u sezoni proizvodnje krumpira koja slijedi nakon one iz podtočke 1.1.2., dopušta se, uz odgovarajući plodored, koji mora biti najmanje dvogodišnji za proizvodnju sjemenskog krumpira, proizvodnja sjemenskog ili merkantilnog krumpira, uz provođenje sustavnog istraživanja iz članka 3. ovoga Pravilnika; ili
 - 1.2.1. tijekom četiri vegetacijske godine koje slijede nakon godine u kojoj je zaraza utvrđena:

- provode se mjere uklanjanja samoniklih biljaka krumpira i drugih samoniklih biljaka domaćina štetnog organizma, i
- polje se održava na ugaru ili kao trajni pašnjak s intenzivnom ispašom ili čestom niskom košnjom,

1.2.2. u prvoj sezoni proizvodnje krumpira koja slijedi nakon razdoblja iz podtočke 1.2.1., pod uvjetom da tijekom provođenja sustavnog istraživanja u najmanje dvije uzastopne vegetacijske godine prije sadnje na polju nisu nađene samonikle biljke krumpira i druge samonikle biljke domaćini, dopušta se proizvodnja sjemenskog ili merkantilnog krumpira, uz testiranje izvađenih krtola sukladno propisanom postupku;

2. Na ostalim poljima unutar zaraženog mjesta proizvodnje pod uvjetom da je fitosanitarni inspektor utvrdio da je otklonjena opasnost od samoniklih biljaka krumpira te drugih biljaka domaćina štetnog organizma:

2.1. u vegetacijskoj godini koja slijedi nakon godine u kojoj je zaraza utvrđena:

- zabranjuje se sadnja gomolja i biljaka krumpira, te sjetva sjemena krumpira u botaničkom smislu ili drugih samoniklih biljaka domaćina štetnog organizma, ili se
- dopušta sadnja certificiranog sjemenskog krumpira namijenjenog isključivo proizvodnji merkantilnog krumpira,

2.2. u drugoj vegetacijskoj godini koja slijedi nakon godine u kojoj je zaraza utvrđena, dopušta se sadnja samo certificiranog sjemenskog krumpira ili sjemenskog krumpira za koji je službenim testiranjem potvrđeno da nije zaražen štetnim organizmom i da je proizveden pod stručnim nadzorom na mjestima proizvodnje koja nisu označena kao zaražena, za sjemensku ili merkantilnu proizvodnju,

2.3. najmanje još u trećoj vegetacijskoj godini koja slijedi nakon godine u kojoj je utvrđena zaraza dopušta se sadnja samo certificiranog sjemenskog krumpira ili sjemenskog krumpira proizvedenog pod stručnim nadzorom iz certificiranog sjemenskog krumpira, za sjemensku ili merkantilnu proizvodnju,

2.4. u svakoj vegetacijskoj godini iz podtočke 2.1., 2.2. i 2.3. ove točke poduzimaju se mjere uklanjanja samoniklih biljaka krumpira i drugih biljaka domaćina štetnog organizma ako su prisutne i provodi se službeno testiranje izvađenog krumpira sa svakog polja sukladno s propisanim postupkom.

3. Odmah nakon utvrđivanja zaraze štetnim organizmom i nakon slijedeće vegetacijske godine, svi strojevi, oprema i skladišni prostori na mjestu proizvodnje koji su se koristili u proizvodnji krumpira moraju se očistiti i dezinficirati primjenom odgovarajućih postupaka sukladno s člankom 12. ovog Pravilnika.

4. U zaštićenim prostorima namijenjenim proizvodnji bilja gdje je moguća potpuna zamjena supstrata za uzgoj:

- zabranjuje se sadnja gomolja i biljaka krumpira te sjetva sjemena krumpira u botaničkom smislu, sve dok se u tom zaštićenom prostoru, pod nadzorom fitosanitarnog inspektora, ne provedu mjere uništavanja štetnog organizma i ukloni sav biljni materijal koji potječe od biljaka domaćina, pri čemu se, kao minimalna mjera, obvezno provodi potpuna zamjena supstrata za uzgoj te čišćenje i dezinfekcija proizvodne jedinice i cjelokupne opreme, i sve dok nakon toga fitosanitarni inspektor ne odobri proizvodnju krumpira, i
- dopušta se sadnja isključivo certificiranog sjemenskog krumpira ili mini-gomolja ili mikro biljaka dobivenih iz kulture biljnog tkiva, koje potječu iz testiranih izvora.

II. U ČITAVOM POSEBICE REGULIRANOM PODRUČJU, PORED MJERA NAVEDENIH U GLAVI I. OVOGA PRIVITKA:

1. Odmah nakon utvrđivanja zaraze fitosanitarni inspektor naređuje, prema potrebi, čišćenje i dezinfekciju svih strojeva, opreme i skladišnih prostora koji su se koristili na takvim posjedima u proizvodnji krumpira primjenom odgovarajućih postupaka sukladno s člankom 12. ovog Pravilnika.
2. Odmah i tijekom najmanje tri vegetacijske godina koje slijede iza one u kojoj je zaraza utvrđena, fitosanitarni inspektor:
 - nadzire posjede na kojima se uzgajaju, skladište, nalaze ili dorađuju gomolji krumpira, uključujući i posjede s kojih i na kojima su se koristili strojevi za obavljanje radnji u svezi s nabrojenim djelatnostima,
 - unutar cijelog posebice reguliranog područja naređuje sadnju isključivo certificiranog sjemenskog krumpira ili sjemenskog krumpira proizvedenog pod stručnim nadzorom, i testiranje nakon vađenja onog sjemenskog krumpira koji je uzgojen na mjestima proizvodnje koja se smatraju vjerojatno zaraženima, sukladno s člankom 7. ovog Pravilnika,
 - naređuje da se na svim posjedima unutar tog područja s proizvedenim sjemenskim krumpirom postupa odvojeno od merkantilnog krumpira, ili da se obavi čišćenje i dezinfekcija između postupanja sa sjemenskim i merkantilnim krumpirom,
 - provodi sustavno istraživanje iz članka 3. ovog Pravilnika.
3. U slučaju potrebe, ministar može narediti zamjenu svih zaliha sjemenskog krumpira u odgovarajućem vremenskom razdoblju.

PRIVITAK II.

ŠEMA TESTIRANJA ZA DIJAGNOSTICIRANJE, DETEKCIJU I IDENTIFIKACIJU PROUZROKOVAČA PRSTENASTE TRULEŽI GOMOLJA KRUMPIRA, BAKTERIJE *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis *et al.* ssp. *sepedonicus* (Spieckermann *et* Kotthoff) Davis *et al.*

PODRUČJE PRIMJENE ŠEME TESTIRANJA

Prikazana šema testiranja opisuje različite postupke za:

- dijagnosticiranje prstenaste truleži u gomoljima i biljkama krumpira;
- detekciju bakterije *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (u daljem tekstu: *C. m. ssp. sepedonicus*) u uzorcima gomolja i biljaka krumpira;
- identifikaciju bakterije *C. m. ssp. sepedonicus*.

OPĆA NAČELA

Optimizirani protokoli za pojedine metode, validirani reagensi i pojedinosti za pripremu materijala za testiranje i kontrolnih materijala navedeni su u Privicima. Popis laboratorija koje su učestvovala u optimizaciji i validaciji protokola nalazi se u Privitku 1.

Obzirom da protokoli uključuju detekciju karantenskog organizma i da podrazumijevaju uporabu živih kultura *C. m. ssp. sepedonicus* kao kontrolnih materijala, postupci će se morati izvoditi u primjerenim karantenskim uvjetima s odgovarajućom opremom za zbrinjavanje otpada te prema uvjetima dozvole koju izdaju nadležna tijela za biljni karanten.

Parametri testiranja moraju osigurati dosljednu i ponovljivu detekciju onih razina prisustva *C. m. ssp. sepedonicus* prema propisanim pragovima detekcije za pojedine metode.

Precizna priprema pozitivnih kontrola je nužna.

Testiranje sukladno s potrebitim pragovima detekcije podrazumijeva pravilno postavljanje, održavanje i kalibriranje opreme, pažljivo pohranjivanje i rukovanje reagensima te poduzimanje mjera za sprječavanje kontaminacije među uzorcima, npr. razdvajanje pozitivnih kontrola od uzoraka za testiranje. Moraju se primijeniti standardi kontrole kvalitete kako bi se izbjegle administrativne i druge pogreške, posebice pri označavanju uzoraka i vođenju dokumentacije.

Sumnja na zarazu, kao što je navedeno u članku 4. stavak (1) Pravilnika o provođenju sustavnog istraživanja i mjera za sprječavanje širenja i suzbijanje prstenaste truleži gomolja krumpira koju prouzrokuje bakterija *C. m. ssp. sepedonicus* (u daljnjem tekstu: Pravilnik), podrazumijeva pozitivan rezultat testa za dijagnosticiranje ili testa provjere provedenog na uzorku kao što je prikazano u dijagramima toka.

Ako je rezultat prvog testa provjere (IF ili PCR/FISH) pozitivan, tada se sumnja na zarazu bakterijom *C. m. ssp. sepedonicus* i mora se provesti drugi test provjere. Ako je rezultat drugog testa provjere pozitivan, tada je sumnja potvrđena i testiranje se mora nastaviti prema šemi testiranja. Ako je rezultat drugog testa provjere negativan, tada se smatra da uzorak nije zaražen bakterijom *C. m. ssp. sepedonicus*.

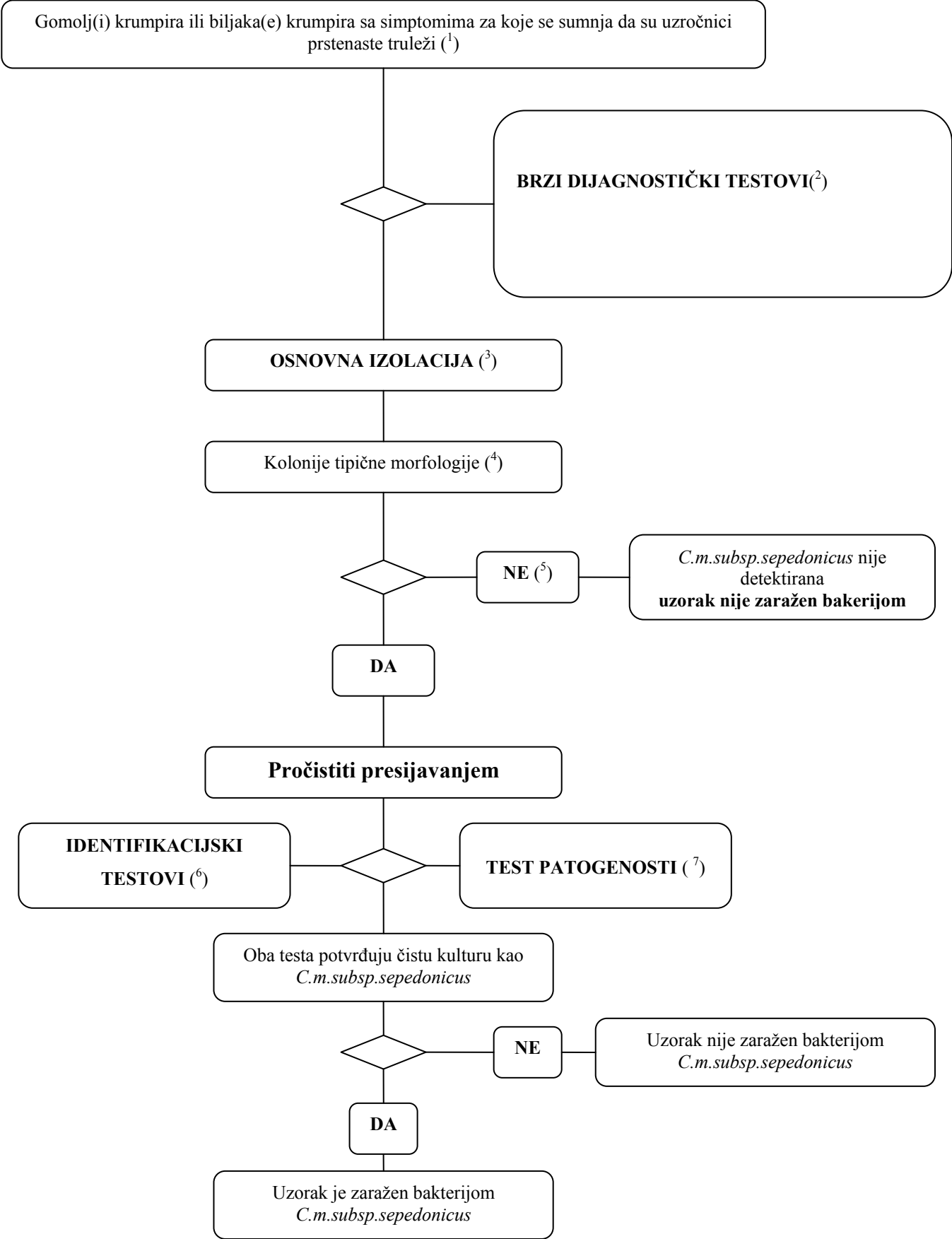
Dakle, pozitivan rezultat IF testa, kao što je navedeno u članku 6. stavak (2) definiramo kao pozitivno očitavanje IF testa koje je potrebno potvrditi drugim testom provjere (PCR/FISH).

Potvrđena zaraza, kao što je navedeno u članku 8. stavak (2) Pravilnika, podrazumijeva izolaciju i identifikaciju čiste kulture *C. m. ssp. sepedonicus*, te potvrdu patogenosti.

1. PRIKAZ DIJAGRAMA TOKA

1.1. Šema za detekciju i dijagnosticiranje uzročnika prstenaste truleži u gomoljima i biljkama krumpira sa simptomima prstenaste truleži

Postupak testiranja je namijenjen za gomolje i biljke krumpira sa simptomima tipičnim za ili koji pobuđuju sumnju na prstenastu trulež. Postupak uključuje brzi test provjere, izolaciju patogena iz zaraženog provodnog tkiva na dijagnostičkoj hranjivoj podlozi i u slučaju pozitivnog rezultata, identifikaciju čiste kulture kao bakterije *C. m. ssp. sepedonicus*.



Gomolj(i) krumpira ili biljaka(e) krumpira sa simptomima za koje se sumnja da su uzročnici prstenaste truleži (1)

BRZI DIJAGNOSTIČKI TESTOVI(2)

OSNOVNA IZOLACIJA (3)

Kolonije tipične morfologije (4)

NE (5)

C.m.subsp.sepedonicus nije detektirana
uzorak nije zaražen bakterijom

DA

Pročistiti presijavanjem

IDENTIFIKACIJSKI TESTOVI (6)

TEST PATOGENOSTI (7)

Oba testa potvrđuju čistu kulturu kao
C.m.subsp.sepedonicus

NE

Uzorak nije zaražen bakterijom
C.m.subsp.sepedonicus

DA

Uzorak je zaražen bakterijom
C.m.subsp.sepedonicus

(1) Opis simptoma naveden je u Dijelu 2.

(2) Prikladni testovi su:

- IF test (Dio 4),
- PCR test (Dio 6),
- FISH test (Dio 5).

(3) Iako je izolacija patogena iz biljnog materijala s tipičnim simptomima metodom razrjeđivanja i zasijavanja na hranjivu podlogu jednostavna, uzgoj može biti neuspješan iz uzoraka u naprednom stadiju infekcije. Saprofitne bakterije koje rastu na oboljelom tkivu mogu prerasti ili inhibirati razvitak patogena na hranjivoj podlozi. Stoga se preporuča korištenje neselektivne i selektivne hranjive podloge, najbolje MTNA (Odjeljak 8) ili biotest (Odjeljak 7).

(4) Opis tipične morfologije kolonije *C. m. ssp. sepedonicus* naveden je u Dijelu 8.

(5) Ako je rezultat izolacije negativan, ali su simptomi bolesti tipični, tada je potrebno ponoviti postupak izolacije.

(6) Pouzdana identifikacija čiste kulture *C. m. ssp. sepedonicus* postiže se provođenjem testova navedenih u Dijelu 9.

(7) Test patogenosti opisan je u Dijelu 10.

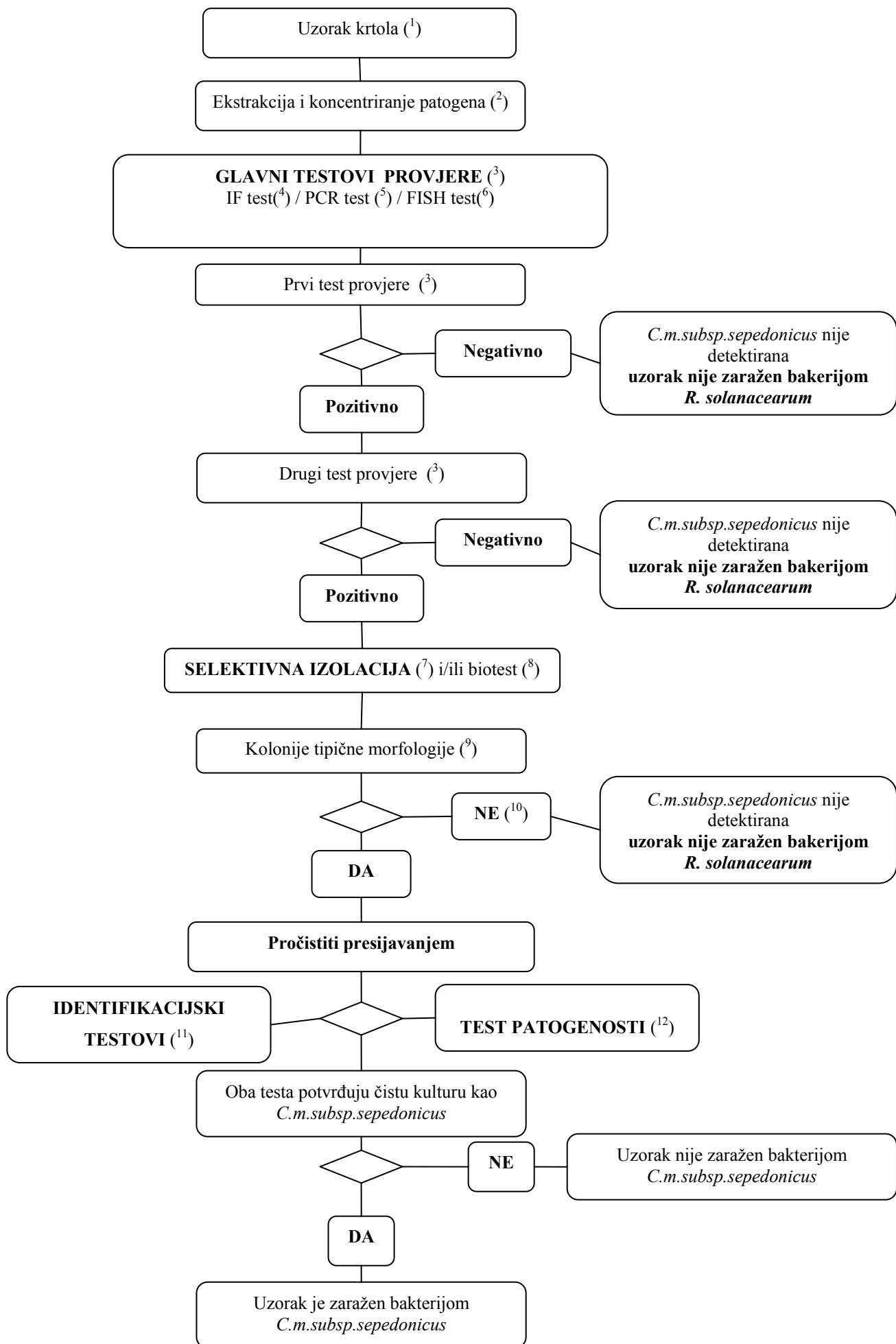
1.2. Šema detekcije i identifikacije bakterije *C. m. ssp. sepedonicus* u uzorcima gomolja krumpira bez simptoma

Načelo

Postupak testiranja namijenjen je za detekciju skrivene zaraze u gomoljima krumpira.

Pozitivan rezultat iz najmanje dva testa provjere, koji se temelje na različitim biološkim načelima, mora se dopuniti izolacijom patogena, nakon kojeg slijedi, u slučaju izolacije tipičnih kolonija, potvrda čiste kulture kao *C. m. ssp. sepedonicus*. Pozitivan rezultat samo jednog od testova provjere nije dovoljan da bi se uzorak smatrao vjerojatno zaraženim.

Testovi provjere i izolacija moraju omogućiti prag detekcije 10^3 do 10^4 stanica/ml resuspendiranog taloga, uključenog kao pozitivna kontrola u svakoj seriji testova.



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

(2) Metode ekstrakcije i koncentriranja patogena opisane su u Dijelu 3.1.

(3) Ako su rezultati najmanje dva testa, koji su utemeljeni na različitim biološkim načelima, pozitivni, potrebno je provesti izolaciju i potvrdu. Provedite barem jedan test provjere. Kada je rezultat tog testa negativan, smatra se da je taj uzorak negativan. U slučaju da je rezultat tog testa pozitivan, potrebno je provesti drugi ili više testova provjere, koji se temelje na različitim biološkim načelima, kako bi se potvrdio pozitivan rezultat. Ako su rezultati drugih ili ostalih testova negativni, smatra se da je taj uzorak negativan. Daljnji testovi nisu potrebni.

(4) Test imunofluorescencije (IF).

Uvijek koristite poliklonska antitijela za IF provjeru, dodatna monoklonska antitijela mogu omogućiti veću specifičnost (vidi Dio 4).

(5) PCR test.

Koristite validirane reagense i protokole za PCR (vidi Dio 6).

(6) FISH test.

Koristite validirane reagense i protokole (vidi Dio 5).

(7) Selektivna izolacija.

Korištenje MTNA ili NCP-88 hranjivih podloga i 1/100 razrijeđenja resuspendiranog taloga je u mnogim slučajevima prikladna metoda za izravnu izolaciju *C. m. ssp. sepedonicus*. Tipične kolonije mogu se dobiti 3 do 10 dana nakon zasijavanja na hranjivu podlogu. Patogen se tada može prečistiti i identificirati. Kako bi se u cijelosti iskoristile mogućnosti testa, potrebna je pažljiva priprema i uklanjanje kore s pupčanog dijela gomolja kako bi se izbjegle sekundarne bakterije s gomolja krumpira, koje na hranjivoj podlozi konkuriraju bakteriji *C. m. ssp. sepedonicus*. i mogu prerasti u patogena. Ako izolacija na hranjivoj podlozi ne uspije, mora se napraviti iz biljaka koje su korištene u biotestu (vidi Dio 8).

(8) Biotest se koristi za izolaciju bakterije *C. m. ssp. sepedonicus* iz macerata vještački inokuliranog patlidžana (*Solanum melongena*). Test zahtijeva optimalne uvjete inkubacije kao što je navedeno u ovoj metodi. Bakterije koje inhibiraju bakteriju *C. m. ssp. sepedonicus* na MTNA ili NCP-88 hranjivim podlogama najvjerojatnije neće smetati u ovom testu (vidi Dio 7).

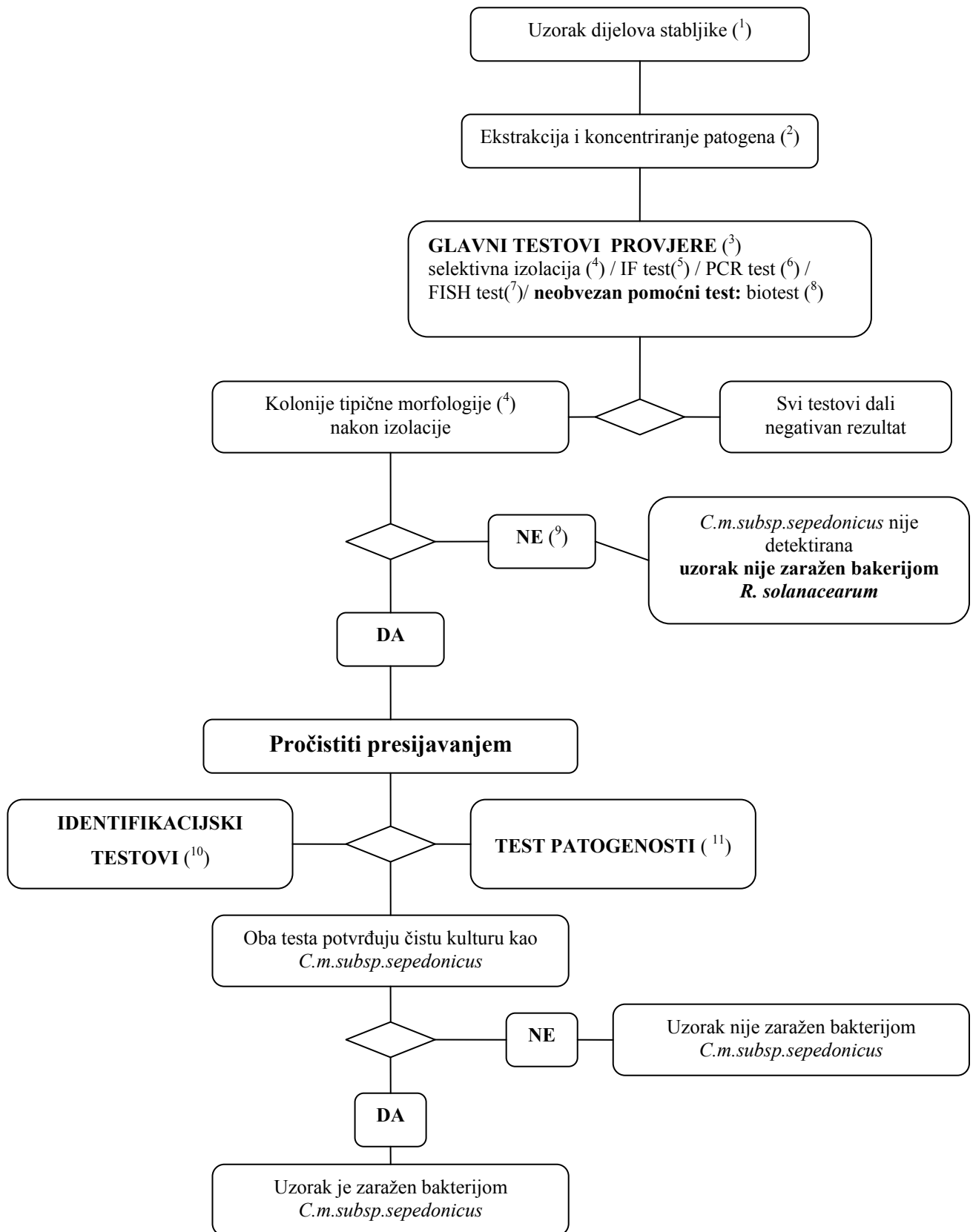
(9) Tipična morfologija kolonije opisana je u Dijelu 8.

(10) Uzgoj bakterijske kulture ili biotest mogu biti neuspješni zbog kompeticije ili inhibicije saprofitnim bakterijama. Ako se testovima provjere dobiju jasno pozitivni rezultati, a rezultati izolacije su negativni, ponovite testove izolacije iz istog resuspendiranog taloga ili ponovite uzimanje provodnog tkiva iz baznog dijela blizu stolona gomolja iz istog uzorka te, ako je potrebno, testirajte dodatne uzorke.

(11) Pouzdana identifikacija čistih kultura *C. m. ssp. sepedonicus* postiže se provođenjem testova opisanih u Dijelu 9.

(12) Test patogenosti opisan je u Dijelu 10.

1.3. Šema za detekciju i identifikaciju bakterije *C. m. ssp. sepedonicus* u uzorcima biljaka krumpira bez simptoma



- (1) Za preporučene veličine uzoraka vidi Dio 3.2.
- (2) Metode ekstrakcije i koncentriranja patogena opisane su u Dijelu 3.2.
- (3) Ako su rezultati najmanje dva testa, koji se temelje na različitim biološkim načelima, pozitivni, potrebno je provesti izolaciju i potvrdu. Provedite barem jedan test provjere. Kada je rezultat tog testa negativan, smatra se da je taj uzorak negativan. U slučaju da je rezultat tog testa pozitivan, potrebno je provesti drugi ili više testova provjere, koji se temelje na različitim biološkim načelima, kako bi se potvrdio pozitivan rezultat. Ako su rezultati drugih ili ostalih testova negativni, smatra se da je taj uzorak negativan. Daljnji testovi nisu potrebni.
- (4) Selektivna izolacija i tipična morfologija kolonije opisani su u Dijelu 8.
- (5) IF test opisan je u Dijelu 4.
- (6) PCR testovi opisani su u Dijelu 6.
- (7) FISH test opisan je u Dijelu 5.
- (8) Biotest opisan je u Dijelu 7.
- (9) Uzgoj bakterijske kulture ili biotest mogu biti neuspješni zbog kompeticije ili inhibicije saprofitnim bakterijama. Ako se testovima provjere dobiju jasno pozitivni rezultati, a rezultati izolacije su negativni, ponovite testove izolacije i, ako je potrebno, testirajte dodatne uzorke.
- (10) Pouzdana identifikacija čistih kultura *C. m. ssp. sepedonicus* postiže se provođenjem testova opisanih u Dijelu 9.
- (11) Test patogenosti opisan je u Dijelu 10.

2. VIZUALNI PREGLED ZA OTKRIVANJE SIMPTOMA PRSTENASTE TRULEŽI

2.1. Biljke krumpira

U europskim klimatskim uvjetima simptomi se rijetko pronalaze u polju i to često tek na kraju sezone. Osim toga, simptomi su često prikriveni ili se mogu zamijeniti s drugim bolestima, starenjem ili mehaničkim oštećenjima. Stoga možemo vrlo lako previdjeti simptome prilikom pregleda u polju. Simptomi venuća vrlo su različiti od onih smeđe truleži; venuće je obično polagano i u početku ograničeno na rubove listova. Mladi zaraženi listovi često nastavljaju rasti, iako manje u zaraženim dijelovima, te su listovi neobičnog oblika. Listovi zbog blokade provodnog tkiva u donjem dijelu stabljike često imaju klorotične, žuto-narančaste dijelove između lisnih žila. Zaraženi listići, listovi, čak i stabljike mogu vremenom odumrijeti. Često su listovi i gomolji samo manje veličine. Povremeno su biljke zakržljale.

2.2. Gomolji krumpira

Najraniji simptomi su lagana staklenost ili prozirnost tkiva bez omekšanja oko provodnog sustava, posebice u blizini pupčanog dijela gomolja. Provodni prsten na pupčanom dijelu gomolja može biti malo tamnije boje od uobičajene. Prvi lako uočljiv simptom je žućkasta boja provodnog prstena, a kada se gomolj nježno stisne, iz žila izlaze male količine sirastog materijala. Taj iscjedak sadrži milijune bakterija. Provodno tkivo može posmeđiti i simptomi na gomolju u ovom stadiju slični su simptomima smeđe truleži koju uzrokuje *Ralstonia solanacearum*. U početku, ti simptomi mogu biti ograničeni na jedan dio provodnog prstena, ne nužno blizu pupčanog dijela gomolje, i mogu se postupno proširiti na cijeli prsten. Kako infekcija napreduje, dolazi do propadanja provodnog tkiva; vanjska i unutarnja kora se mogu razdvojiti. U naprednim stadijima infekcije, na površini gomolja pojavljuju se pukotine, koje su često crvenkasto-smeđe po rubovima. Nedavno se u Europi pojavilo nekoliko slučajeva u kojima je središte gomolje trunulo istovremeno s provodnim prstenom što je dovelo do sekundarnog napada i unutarnjim stvaranjem šupljina i nekroza. Sekundarni napad gljiva ili

bakterija može prikriti simptome i može biti teško, čak nemoguće, razlikovati uznapredovale simptome prstenaste truleži od drugih truleži gomolja. Mogući su netipični simptomi.

3. PRIPREMA UZORKA

3.1. Gomolji krumpira

Napomena:

- Standardna veličina uzorka je 200 gomolja po testu. Intenzivnije uzorkovanje zahtijeva testiranje više uzoraka iste veličine. Veći broj gomolja u uzorku dovodi do inhibicije ili će otežati tumačenje rezultata. Međutim, postupak se može prikladno primijeniti za uzorke s manje od 200 gomolja, kada je na raspolaganju manje gomolja.
- Validacija svih metoda za detekciju, koje su opisane u daljnjem tekstu, temelji se na testiranju uzoraka od 200 gomolja.
- ekstrakt krumpira koji je opisan u daljnjem tekstu može se koristiti i za detekciju uzročnika smeđe truleži krumpira, bakterije *Ralstonia solanacearum*.

Neobvezna obrada gomolja prije pripreme uzorka

Operite gomolje. Uporabite prikladna dezinfekcijska sredstva (spojeve klora kada će se provesti PCR test kako bi se uklonila moguća DNK patogena) i deterdžente između svakog uzorka. Osušite gomolje na zraku. Postupak pranja je posebice koristan (ali ne obvezan) za uzorke s previše tla i ako će se provesti PCR test ili izravna izolacija.

3.1.1. Čistim i dezinficiranim skalpelom ili nožem uklonite koru na krajevima pupčanog dijela gomolje tako da provodno tkivo bude vidljivo. Pažljivo izrežite mali isječak provodnog tkiva na kraju pupčanog dijela gomolje (u daljem tekstu: isječak) pazeći da zahvatite što manje okolnog, neprovodnog tkiva.

Napomena:

Odvojite sve gomolje s mogućim simptomima prstenaste truleži i testirajte posebice.

Ako prilikom odstranjivanja isječka opazite moguće simptome prstenaste truleži, gomolje treba vizualno pregledati nakon što se prereže blizu pupka. Svaku prerezanu gomolju s mogućim simptomima treba ostaviti na sobnoj temperaturi dva dana da suberizira i pohraniti u karantenskim uvjetima (na 4 do 10°C) sve dok se ne dovrše svi testovi. Svi gomolji u uzorku (uključujući one sa sumnjivim simptomima) trebaju se čuvati sukladno članku 8. Pravilnika.

3.1.2. Stavite isječke u neuporabljene posude za jednokratnu uporabu koje se mogu zatvoriti i/ili hermetički zatvoriti (ako su posude već uporabljavane, moraju se temeljito očistiti i dezinficirati spojevima klora). Poželjno ih je odmah obraditi. Ako to nije moguće, čuvajte ih u posudi bez dodatka pufera, najdulje 72 sata u hladnjaku ili najdulje 24 sata na sobnoj temperaturi. Sušenje i suberizacija isječka, kao i rast saprofita tijekom pohrane mogu ometati detekciju bakterije uzročnika prstenaste truleži.

3.1.3. Obradite isječke jednim od slijedećih postupaka:

(a) dodati dovoljnu količinu (oko 40 ml) ekstrakcijskog pufera (Dodatak 3) da pokrije isječke i tresti na rotacijskoj tresilici (50 do 100 okretaja/min) četiri sata na temperaturi ispod 24°C ili 16 do 24 sata uz hlađenje,

ili

(b) homogenizirajte isječke s dovoljnom količinom (oko 40 ml) ekstrakcijskog pufera (Dodatak 3), bilo u miješalici (npr. Waring ili Ultra Thurax) bilo drobljenjem u dobro zatvorenoj vrećici za maceraciju za jednokratnu uporabu (npr. vrećice Stomacher ili Bioreba od čvrstog politena, 150 mm x 250 mm, sterilizirane zračenjem) koristeći gumeni čekić ili prikladnu drobilicu (npr. Homex).

Napomena:

Ako se uzorci homogeniziraju u miješalici, postoji velika opasnost od njihove unakrsne kontaminacije. Poduzmite mjere opreza kako biste spriječili nastajanje aerosola ili razlijevanje tijekom postupka ekstrakcije. Pobrinite se da za svaki uzorak uporabite svježe sterilizirane nožiče i posude miješalice. Ako će se provesti PCR test, spriječite prijenos DNK na spremnike ili drobilicu. Za PCR test preporuča se drobljenje u vrećicama za jednokratnu uporabu i korištenje epruveta za jednokratnu uporabu.

3.1.4. Odlijte supernatant. Ako je previše mutan, razbistrite ga sporim centrifugiranjem (na najviše 180 g 10 minuta na temperaturi od 4 do 10°C) ili vakuumskom filtracijom (40 do 100 µm), i dodatno isperite filter ekstrakcijskim puferom (oko 10 ml) (Dodatak 3).

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

3.1.6. Resuspendirajte talog u 1,5 ml pufera za talog (Dodatak 3). Uporabite 500 µl za testiranje na *C. m. ssp. sepedonicus*, 500 µl za *Ralstonia solanacearum* i 500 µl kao referentni materijal. Dodajte sterilni glicerol konačnoj koncentraciji od 10 do 25% (v/v) 500 µl referentnog alikvota i preostalom testnom alikvotu, promiješajte i uskladištite na temperaturi od -16 do -24 °C (tjednima) ili na -68 do -86 °C (mjesecima). Testne alikvote čuvajte na 4 do 10°C tijekom testiranja.

Ne preporuča se višekratno zamrzavanje i otapanje.

Ako je potrebit transport ekstrakta, osigurajte dostavu u prijenosnome hladnjaku u roku od 24 do 48 sati.

3.1.7. Sve pozitivne kontrole i uzorci *C. m. ssp. sepedonicus* moraju se odvojeno pripremiti i obraditi kako bi se izbjegla kontaminacija. To vrijedi za stakalca za imunofluorescenciju, kao i za sve ostale testove.

3.2. Biljke krumpira

Napomena:

Za detekciju latentnih populacija bakterije *Ralstonia solanacearum* preporuča se testiranje sastavljenih uzoraka. Postupak se može prikladno primijeniti na sastavljene uzorke s najviše 200 dijelova stabljika. (Ako se provodi sustavni nadzor, on se mora temeljiti na statistički reprezentativnom uzorku biljne populacije koja se ispituje).

3.2.1. Čistim dezinficiranim nožem ili vrtlarskim škarama odrežite dio dug 1 do 2 cm s donjeg dijela svake stabljike, odmah iznad površine tla.

Kratko dezinficirajte dijelove stabljika 70% etanolom i odmah posušite papirnatom ubrusom.

Stavite dijelove stabljika u zatvorenu sterilnu posudu prema jednom od slijedećih postupaka:

3.2.2. Obradite dijelove stabljika pomoću jednog od slijedećih postupaka:

(a) prekrijte ih dovoljnom količinom (približno 40 ml) ekstrakcijskog pufera (Dodatak 3) i tresite na rotacijskoj tresilici (50 do 100 okretaja/min) četiri sata na temperaturi ispod 24 °C ili 16 do 24 sata uz hlađenje, ili

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

3.2.3. Nakon 15 minuta taloženja, izlijte supernatant.

3.2.4. Dodatno bistrenje ekstrakta ili koncentriranje bakterijske frakcije obično nije potrebno, ali se može postići filtriranjem i/ili centrifugiranjem kako je opisano u dijelu 3.1.4 do 3.1.6.

3.2.5. Podijelite čisti ili koncentrirani ekstrakt uzorka na dva jednaka dijela. Jednu polovicu čuvajte na temperaturi od 4 do 10°C tijekom testiranja, a drugu polovicu pohranite s 10-25% (v/v) sterilnog glicerola na temperaturi od –16 do –24°C (tjednima) ili na –68 do –86 °C (mjesecima) u slučaju da je potrebno daljnje testiranje.

4. IF TEST

Načelo

Uporaba IF testa kao glavnog testa provjere preporuča se zbog njegove dokazane dosljednosti pri postizanju zahtijevanih pragova detekcije.

Kada se IF test koristi kao glavni test provjere i ako je IF očitavanje pozitivno, mora se provesti PCR test ili FISH test kao drugi test provjere. Kada se IF test koristi kao drugi test provjere i IF očitavanje je pozitivno, potrebno je daljnje testiranje prema dijagramu toka kako bi se dovršila analiza.

Napomena:

Uvijek koristite poliklonska antitijela kada se IF test koristi kao glavni test provjere. U slučaju pozitivnog IF očitavanja s poliklonskim antitijelima, daljnja provjera uzorka s monoklonskim antitijelima može omogućiti veću specifičnost, ali može biti manje osjetljiva.

Uporabite antitijela na referentni soj *C. m. ssp. sepedonicus*. Preporuča se da se titar odredi za svaku novu seriju antitijela. Titar se definira kao najveće razrijeđenje kod kojeg dolazi do optimalne reakcije pri testiranju suspenzije koja sadrži 10^5 do 10^6 stanki po ml homolognog soja *C. m. ssp. sepedonicus* uz korištenje fluorescein-izotiocijanata (FITC) konjugiranih antitijela sukladno s preporukama proizvođača. Nerazrijeđena poliklonska i monoklonska antitijela trebaju imati IF titar najmanje 1:2000. Tijekom testiranja treba koristiti radna razrijeđenja antitijela, koja su blizu ili jednaka titru. Koristite validirana antitijela.

Test treba provesti na svježe pripremljenim ekstraktima uzoraka. On se, po potrebi, može uspješno provesti i na ekstraktima koji su bili pohranjeni na temperaturi od – 68 do – 86°C s dodatkom glicerola. Glicerol se može ukloniti dodavanjem 1 ml pufera za talog (Dodatak 4), ponovnim 15-minutnim centrifugiranjem na 7000 g i resuspendiranjem u jednakom volumenu pufera za talog. To je rijetko potrebno, naročito ako su uzorci plamenom fiksirani na stakalca (vidi 2.2).

Za pozitivnu kontrolu pripremite odvojena stakalca s homolognim sojem ili nekim drugim referentnim sojem bakterije *C. m. ssp. sepedonicus*, suspendiranim u ekstraktu krumpira kako je navedeno u Dodatku 2, ili po izboru u puferu.

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

Za negativnu kontrolu mogu se uporabiti alikvoti ekstrakta uzoraka koji su u ranijem testiranju pokazali negativan rezultat.

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

Kontrolni materijal testirajte jednako kao i uzorke.

4.1. Pripremite stakalca za testiranje prema jednom od slijedećih postupaka:

(i) Za taloge s relativno malo skroba:

U prvi otvor pipetom odmjerite standardni volumen ($15\ \mu\text{l}$ je dovoljno za otvore promjera 6 mm – za veće otvore povećajte volumen) razrjeđenja od 1/100 resuspendiranog taloga krumpira. Potom u ostale otvore u istom redu pipetom odmjerite slični volumen nerazrijeđene suspenzije (1/1) taloga. Drugi se red može koristiti za duplikat istog ili za drugi uzorak kako je prikazano na slici 1.

(ii) Za ostale suspenzije taloga:

Pripremite decimalna razrjeđenja (1/10, 1/100) resuspendiranog taloga u puferu za talog. U jedan red otvora pipetom odmjerite standardni volumen ($15\ \mu\text{l}$ je dovoljno za otvore promjera 6 mm – za veće otvore povećajte volumen) resuspendiranog taloga i svakog razrjeđenja. Drugi se red može koristiti kao duplikat istog ili za drugi uzorak kao što je prikazano na slici 2.

4.2. Ostavite da se kapljice osuše na sobnoj temperaturi ili ih zagrijavajte do temperature od 40 do 45°C . Fiksirajte bakterijske stanice na stakalce bilo zagrijavanjem (15 minuta na 60°C), provlačenjem kroz plamen, 95%-tnim etanolom ili prema posebnim napucima dobavljača antitijela.

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

4.3. IF postupak:

(i) Sukladno s postupkom za pripremu stakalaca za testiranje kako je opisano pod 4.1(i):

Pripremite niz dvostrukih razrjeđenja antitijela u IF puferu. Prvi otvor mora imati 1/2 titra (T/2), a ostali 1/4 titra (T/4), 1/2 titra (T/2), titar (T) i dvostruki titar (2T).

(ii) Sukladno s postupkom za pripremu stakalaca za testiranje kako je opisano pod 4.1(ii):

Pripremite radno razrjeđenje antitijela u IF puferu. Radno razrjeđenje utječe na specifičnost.

Slika 1. Priprema stakalca sukladno s točkama 4.1.(i) i 4.3.(i)

Razrjeđenja rastvorenog taloga

1/100 1/1 1/1 1/1 1/1 □ razrjeđenja

(T = titar)	T/2	T/4	T/2	T	2T	rastvorenog taloga □ dvostruka razrjeđenja seruma/antitijela
Uzorak 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Duplikat uzorka 1 ili uzorka 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

Slika 2. Priprema stakalaca sukladno s točkama 4.1. (ii) i 4.3.(ii)

Radna razrjeđenja seruma/antitijela

	1/1	1/10	1/100	prazno	prazno	□ decimalna razrjeđenja rastvorenog taloga
Uzorak 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Duplikat uzorka 1 ili uzorka 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

4.3.1. Posložite stakalca na navlaženi upijajući papir. Svaki otvor potpuno prekritje razrjeđenjem antitijela. Volumen antitijela koji se stavlja u pojedini otvor mora biti jednak volumenu stavljenog ekstrakta.

Slijedite slijedeći postupak ako nema posebnih naputaka dobavljača antitijela:

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

4.3.3. Otresite kapljice sa svakog stakalca i pažljivo ih isperite IF puferom. Potopite ih 5 minuta u IF pufer-Tween (Dodatak 3) i nakon toga u IF pufer. Pazite da ne dođe do stvaranja aerosola ili prijenosa kapljica jer bi to moglo dovesti do unakrsne kontaminacije. Stakalca pažljivo osušite upijajućim papirom.

4.3.4. Posložite stakalca na navlaženi upijajući papir. Otvore prekritje razrijeđenim FITC konjugatom koji se koristi za određivanje titra. Volumen konjugata nanesenog na otvore mora biti jednak volumenu nanesenog antitijela.

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

4.3.6. Otrсите kapljice konjugata sa stakalca. Isperite i operite kako je prethodno opisano (4.3.3).

Pažljivo posušite.

4.3.7. Na svaki otvor pipetom nanosite 5-10 μ l 0,1 M glicerola s fosfatnim puferom (Dodatak 3) ili sredstvo protiv izbljeđivanja koje je dostupno na tržištu te stavite pokrovno stakalce.

4.4. Očitavanje IF testa:

4.4.1. Pregledajte pripremljena stakalca pod epifluorescentnim mikroskopom s odgovarajućim filtrima za ekscitaciju FITC-a, uz uljnu imerziju i povećanje od 500-1000 x. Pregledajte svaki otvor preko dva međusobno okomita promjera i duž vanjskog ruba. Za uzorke u kojima je vidljiv mali broj stanica ili ih uopće nema pregledajte najmanje 40 mikroskopskih vidnih polja.

Najprije pregledajte stakalce s pozitivnom kontrolom. Stanice moraju snažno fluorescirati i moraju biti potpuno obojene na utvrđenom titru antitijela ili radnog razrjeđenja. U slučaju da kod obojenosti dođe do odstupanja, IF test se mora ponoviti (Dio 4).

4.4.2. Pregledajte da li su u otvorama vidljive jasno fluorescirajuće stanice karakteristične morfologije za bakteriju *C. m. ssp. sepedonicus*.

Intenzitet fluorescencije mora biti jednak ili bolji kao i kod pozitivnog kontrolnog soja pri jednakom razrjeđenju antitijela. Stanice s nepotpunim obojenjem ili sa slabom fluorescencijom moraju se zanemariti.

Test se mora ponoviti ako se sumnja na kontaminaciju. Sumnjati se može ako sva stakalca u seriji pokazuju pozitivne stanice zbog kontaminacije pufera ili ako su pozitivne stanice pronađene (izvan otvora) na površini stakalca.

4.4.3. Postoji nekoliko problema u svezi sa specifičnošću testa imunofluorescencije. U koncentriranom ekstraktu isječaka krumpira ili dijelova stabljika mogu se nalaziti populacije fluorescirajućih stanica netipične morfologije i saprofitne bakterije s kojima dolazi do unakrsne reakcije i koje su po veličini i morfologiji slične bakteriji *C. m. ssp. sepedonicus*.

4.4.4. U obzir uzmite samo fluorescirajuće stanice tipične veličine i morfologije u titru ili radnom razrjeđenju antitijela kako je opisan u točki u 4.3.

4.4.5. Tumačenje očitavanja IF testa:

(i) Ako nađete jasno fluorescirajuće stanice karakteristične morfologije, odredite prosječni broj tipičnih stanica po mikroskopskom vidnom polju i izračunajte broj tipičnih stanica po ml resuspendiranog taloga (Dodatak 4).

Očitavanje IF testa je pozitivno za uzorke koji imaju najmanje 5×10^3 tipičnih stanica po ml resuspendiranog taloga. Uzorak se smatra potencijalno kontaminiranim i potrebno je daljnje testiranje.

(ii) Očitavanje IF testa je negativno za uzorke koji imaju manje od 5×10^3 stanika po ml resuspendiranog taloga te se uzorak smatra negativnim. Nije potrebno daljnje testiranje.

5. FISH TEST

Načelo

Kada se FISH test koristi kao prvi test provjere i ako se njime dobije pozitivan rezultat, mora se provesti IF test kao drugi obvezni test provjere. Ako se FISH test koristi kao drugi test provjere i ako se njim dobije pozitivan rezultat, za postavljanje konačne dijagnoze treba obaviti daljnje testiranje prema dijagramu.

Napomena:

Koristite validirane oligo-probe specifične za bakteriju *C. m. ssp. sepedonicus* (Dodatak 7). Preliminarna testiranja ovom metodom trebaju omogućiti ponovljivu detekciju najmanje 10^3 do 10^4 stanica bakterije *C. m. ssp. sepedonicus* po ml koje su dodane ekstraktima uzoraka koji su u ranijim testiranjima bili negativni.

Slijedeći je postupak najbolje provesti na svježe pripremljenim ekstraktima uzoraka, ali se može uspješno primijeniti i na ekstraktu uzorka koji je bio pohranjen s glicerolom na temperaturi od -16 do -24°C ili od -68 do -86°C .

Za negativnu kontrolu uporabite alikvote ekstrakta uzoraka koji su u ranijem testiranju na prisustvo *C. m. ssp. sepedonicus* bili negativni.

Za pozitivnu kontrolu pripremite suspenzije koje sadrže 10^5 do 10^6 stanica/ml 0,01 M fosfatnog pufera (PB) bakterije *C. m. ssp. sepedonicus* (npr. soj NCPPB 4053, ili PD 406) iz kulture stare 3-5 dana (za pripremu vidi Dodatak 2). Pripremite odvojena stakalca za pozitivnu kontrolu s homolognim sojem ili nekim drugim referentnim sojem bakterije *C. m. ssp. sepedonicus*, suspendiranim u ekstraktu krumpira, kao što je navedeno u Dodatku 2.

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

Kontrolni materijal testirajte jednako kao i uzorke.

5.1. Fiksiranje ekstrakta krumpira

Slijedeći protokol temelji se na Wullings i sar., (1998.):

5.1.1. Pripremite otopinu za fiksiranje (vidi Dodatak 7.).

5.1.2. Pipetom odmjerite 100 μl svakog ekstrakta uzorka u Eppendorf tubu te centrifugirajte 8 minuta na 7000 g.

5.1.3. Uklonite supernatant i resuspendirajte talog u 500 μl fiksativa pripremljenog prije najviše 24 sata. Promiješajte na vortex miješalici i inkubirajte jedan sat u hladnjaku.

Alternativni fiksativ je 96% etanol. Pri tome je potrebno resuspendirati talog iz koraka 5.1.2 u 50 μl 0,01M PB i 50 μl 96 % etanola. Promiješajte na vortex miješalici i inkubirajte na 4°C 30 do 60 minuta.

5.1.4. Centrifugirajte 8 minuta na 7000 g, uklonite supernatant te resuspendirajte talog u 75 μl 0,01M PB (vidi Dodatak 3).

5.1.5. U otvore čistog stakalca nanosite 16 μl fiksiranih suspenzija kako je prikazano na slici 3. Na svako stakalce nanosite nerazrijeđena dva različita uzorka i uporabite 10 μl za pripremanje razrijeđenja 1:100 (u 0,01 M PB). Preostalu fiksiranu otopinu uzorka (49 μl) možete pohraniti na -20°C nakon dodavanja jednog volumena 96%-tnog etanola. Ako FISH test trebate ponoviti, centrifugiranjem uklonite etanol i dodajte jednaki volumen 0,01 PB (promiješati na vortex miješalici).

Slika 3. Prikaz stakalca za FISH test

Uzorak 1	Prazno	Prazno	Prazno	Uzorak 2
○	○	○	○	○
Otvor 1	Otvor 2	Otvor	Otvor	Otvor
Uzorak 1	Prazno	Prazno	Prazno	Uzorak 2

○	○	○	○	○
Otvor	Otvor	Otvor	Otvor	Otvor
Pokrovno stakalce 1			Pokrovno stakalce 2	

5.1.6. Stakalca osušite na zraku (ili u sušioniku na 37 °C) te ih fiksirajte provlačenjem kroz plamen.

Na ovom se koraku postupak može prekinuti i nastaviti slijedeći dan. Stakalca se trebaju pohraniti na sobnoj temperaturi u suhom prostoru bez prašine.

5.2. Predhibridizacija i hibridizacija

5.2.1. Pripremite otopinu lizozima koja sadrži 10 mg lizozima (Sigma L-6876) u 10 ml pufera (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8,0). Ta se otopina može pohraniti, ali se smije samo jednom odmrznuti i otopiti. Dobro prekritije svaki uzorak s približno 50 µl otopine lizozima i inkubirajte 10 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim samo jednom umočite objektna stakalca u demineraliziranu vodu i pažljivo osušite filter papirom.

Alternativno umjesto lizozima dodajte 50 µl 40 do 400 µg ml⁻¹ proteinaze K u puferu (20 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl₂, pH 7,4) na svaki otvor i inkubirajte na 37°C 30 minuta.

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

5.2.3. Pripremite vlažnu komoru za inkubaciju tako što ćete dno hermetičke kutije prekriti upijajućim ili filter papirom namočenim u 1x hybmix (Dodatak 7). Kutiju prethodno inkubirajte u hibridizacijskoj pećnici na 55°C najmanje 10 minuta.

5.2.4. Pripremite 45 µl hibridizacijske otopine po stakalcu (Dodatak 7) i prethodno inkubirajte pet minuta na 55°C.

5.2.5. Stavite stakalca na grijaću podlogu na 45°C i nanesite po 10 µl hibridizacione otopine na svaki od četiri otvora.

5.2.6. Stavite dva pokrovna stakalca (24×24 mm) na svako stakalce pazeći pri tom da u otvorima ne ostane zraka. Stavite stakalca u prethodno zagrijanu vlažnu komoru i hibridizirajte preko noći u pećnici na 55°C.

5.2.7. Pripremite tri posude sa 1 l ultra čiste vode, 1 l 1x hybmix (334 ml 3x hybmix i 666 ml ultra čiste vode) i 1 l 1/2x hybmix (167 ml 3x hybmix i 833 ml ultra čiste vode). Svaku posudu prethodno inkubirajte u vodenom kupatilu pri 55°C.

5.2.8. Skinite pokrovna stakalca, a predmetna stakalca stavite na držač.

5.2.9. Višak probe isperite inkubiranjem 15 minuta na 55°C u posudi s 1x hybmixa.

5.2.10. Prenesite držač stakalaca u otopinu za pranje (1/2 x hybmix) i inkubirajte još 15 minuta.

5.2.11. Stakalca nakratko uronite u ultra čistu vodu te ih stavite na filter papir. Višak vlage uklonite tako što ćete površinu lagano pokriti filter papirom. U svaki otvor pipetom nanesite 5 do 10 µl zaštitne otopine protiv izbljeđivanja (npr. Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA ili ekvivalentna) te cijelo predmetno stakalce pokrijte velikim pokrovnim stakalcem (24 x 60 mm).

5.3. Očitavanje FISH testa

5.3.1. Stakalca odmah pregledajte epifluorescentnim mikroskopom uz uljnu imerziju, s povećanjem od 630 ili 1000 x. S filterom prikladnim za fluorescein-izotiocijanat (FITC), eubakterijske stanice (uključujući većinu gram negativnih stanica) u uzorku vide se kao fluorescentno zelene. Uporabom filtra za tetrametilrodamin-5-izotiocijanat stanice bakterije *C. m. ssp. sepedonicus*, obojene s Cy 3, vide se kao fluorescentno crvene. Usporedite morfologiju stanice s morfologijom pozitivnih kontrola. Stanice moraju biti jasno fluorescentne i u cijelosti obojene. Ako dođe do odstupanja u obojenosti, FISH test (Dio 9.4) se mora ponoviti. Pregledajte svaki otvor duž dva međusobno vertikalna promjera i duž vanjskog ruba. Za uzorke u kojima je vidljiv mali broj stanica ili ih uopće nema pregledajte najmanje 40 mikroskopskih vidnih polja.

5.3.2. Pregledajte da li su u otvorama vidljive jasno fluorescirajuće stanice karakteristične morfologije za bakteriju *C. m. ssp. sepedonicus* (vidi mrežnu stranicu: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Intenzitet fluorescencije mora biti jednak ili bolji nego na soju pozitivne kontrole. Stanice koje nisu u potpunosti obojene ili su slabe fluorescencije ne smiju se uzeti u obzir.

5.3.3. Test se mora ponoviti ako se sumnja na kontaminaciju. Sumnjati se može ako sva stakalca u seriji pokazuju pozitivne stanice zbog kontaminacije pufera ili ako su pozitivne stanice pronađene (izvan otvora) na površini stakalca.

5.3.4. Postoji nekoliko problema u svezi sa specifičnostima FISH testa. U koncentriranom ekstraktu isječaka krumpira i dijelova stabljika mogu se pojaviti, iako rjeđe nego kod IF testa, populacije fluorescirajućih stanica netipične morfologije i saprofitne bakterije koje su po veličini i morfologiji slične bakteriji *C. m. ssp. sepedonicus*.

5.3.5. U obzir uzmite samo fluorescirajuće stanice tipične veličine i morfologije, vidi 5.3.2.

5.3.6. Tumačenje rezultata FISH testa:

(i) Rezultati FISH testa smatraju se valjanima ako se primjenom FITC filtra opaze zeleno fluorescirajuće stanice čija je veličina i morfologija tipična za bakteriju *C. m. ssp. sepedonicus* i ako se primjenom filtra za rodamin opaze crveno fluorescirajuće stanice, i to u svim pozitivnim kontrolama i niti jednoj negativnoj kontroli. Ako se pronađu jasno fluorescirajuće stanice karakteristične morfologije, odredite prosječni broj tipičnih stanica po mikroskopskom vidnom polju i izračunajte broj tipičnih stanica po ml resuspendiranog taloga (Dodatak 4). Uzorci s najmanje 5×10^3 tipičnih stanica po ml resuspendiranog taloga smatraju se potencijalno kontaminiranim. Potrebni su dalji testovi. Uzorci s manje od 5×10^3 tipičnih stanica po ml resuspendiranog taloga smatraju se negativnima.

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

6. PCR TEST

Načela

Kada se PCR test koristi kao glavni test provjere i rezultat je pozitivan, mora se provesti IF test izolacija kao drugi obvezni test provjere. Kada se PCR test koristi kao drugi test provjere i rezultat je pozitivan, za postavljanje konačne dijagnoze potrebno je daljnije testiranje prema dijagramu.

Korištenje ove metode kao glavnog testa provjere preporuča se samo ako ste stručno osposobljeni.

Napomena:

Preliminarno testiranje ovom metodom treba omogućiti ponovljivu detekciju 10^3 do 10^4 stanica bakterije *C. m. ssp. sepedonicus* po ml, koje su dodane ekstraktima uzoraka koji su u prethodnim testiranjima dali negativni rezultat. Kako bi se postigao najveći stupanj osjetljivosti i specifičnosti u svim laboratorijima, mogu biti potrebni ogledi za optimizaciju metode.

Koristite validirane reagense i protokole za PCR. Poželjno je odabrati metodu s internom kontrolom.

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

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

U PCR test treba uključiti slijedeće negativne kontrole:

- 1) ekstrakt uzorka koji je u ranijem testiranju na *C. m. ssp. sepedonicus* bio negativan,
- 2) pufer korišten za ekstrakciju bakterije i DNK iz uzorka,
- 3) reakcijsku smjesu za PCR.

U PCR test treba uključiti i slijedeće pozitivne kontrole:

- 4) alikvete resuspendiranih taloga u koje je dodana bakterija *C. m. ssp. sepedonicus* (za pripremu vidi Dodatak 2),
- 5) suspenziju u vodi od 10^6 stanica po ml *C. m. ssp. sepedonicus* virulentnog izolata (npr. NCPPB 2140 ili NCPPB 4053),
- 6) ako je moguće, u PCR testu uporabite i DNK ekstrahiranu iz ranijih pozitivnih kontrolnih uzoraka.

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

Ekstrakti uzoraka moraju sadržavati što je moguće manje tla. Ako namjeravate primjenjivati PCR protokole, u nekim bi slučajevima, stoga, bilo preporučljivo oprati gomolje prije pripreme ekstrakta.

6.1. Metode prečišćavanja DNK

Koristite uzorke za pozitivnu i negativnu kontrolu kako je gore opisano. Pripremite kontrolni materijal na jednaki način kao i uzorke.

Postoje različite metode za prečišćavanje ciljne DNK iz kompleksnih uzoraka, kojima se uklanjaju inhibitori PCR reakcije i drugih enzimskih reakcija te se u ekstraktu uzorka koncentrira ciljna DNK.

Slijedeća je metoda optimizirana za korištenje s validiranom PCR metodom koja je navedena u Dodatku 6.

6.1.(a) Metoda prema Pastriku (2000)

- 1) Pipetom odmjerite 220 μ l pufera za lizu [Š100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)] u Eppendorf tubu (u daljem tekstu: tubu) od 1,5 ml.
- 2) Dodajte 100 μ l ekstrakta uzorka i stavite u blok za zagrijavanje ili vodeno kupatilo na 95°C 10 minuta.
- 3) Stavite tube na led na pet minuta.
- 4) Dodajte 80 μ l osnovne otopine lizozima (50 mg lizozima po ml u 10 mM Tris HCl, pH 8,0) i inkubirajte na 37°C 30 minuta.

- 5) Dodajte 220 μ l Easy DNA® otopine A (Invitrogen), dobro promiješajte na vortex miješalici i inkubirajte na 65°C 30 minuta.
- 6) Dodajte 100 μ l Easy DNA® otopine B (Invitrogen), snažno miješajte na vortex miješalici sve dok precipitat ne bude slobodno kružio po tubi i dok uzorak ne bude jednoliko viskozan.
- 7) Dodajte 500 μ l hloroforma te miješajte na vortex miješalici dok se viskoznost ne smanji i smjesa postane homogena.
- 8) Centrifugirajte na 15000 g 20 minuta na 4°C da se odijele faze i stvori interfaza.
- 9) Prenesite gornju fazu u novu Eppendorfovu tubu.
- 10) Dodajte 1 ml 100% etanola (-20°C), kratko promiješajte na vortex miješalici i inkubirajte na ledu 10 minuta.
- 11) Centrifugirajte na 15000 g 20 minuta na 4°C te uklonite etanol.
- 12) Dodajte 500 μ l 80% etanola (-20°C) i promiješajte okretanjem tube.
- 13) Centrifugirajte na 15000 g 10 minuta na 4°C, sačuvajte talog, a etanol uklonite.
- 14) Ostavite talog da se suši na zraku ili u vakuumskoj centrifugi (DNA speed vac).
- 15) Resuspendirajte talog u 100 μ l sterilne ultra čiste vode i ostavite na sobnoj temperaturi najmanje 20 minuta.
- 16) Čuvajte na -20°C sve dok nije potrebit za PCR.
- 17) Centrifugiranjem izdvojite mogući bijeli precipitat te za PCR uporabite 5 μ l supernatanta koji sadrži DNK.

6.1.(b) Druge metode

Mogu se primijeniti druge metode za ekstrakciju DNK (npr. Qiagen DNeasy Plant Kit) ako su dokazano jednako djelotvorne u prečišćavanju DNK iz kontrolnih uzoraka koji sadrže 10^3 do 10^4 patogenih stanica po ml.

6.2. PCR

6.2.1. Pripremite test i kontrolne uzorke za PCR prema validiranim protokolima (Dodatak 6). Pripremite jedno decimalno razrjeđenje ekstrakta DNK iz uzorka (1:10 u ultra čistoj vodi).

6.2.2. U nekontaminiranom prostoru pripremite odgovarajuću reakcijsku smjesu za PCR prema objavljenim protokolima (Dodatak 6). Validirani protokol za multipleks PCR uključuje unutarnju kontrolu.

6.2.3. Dodajte 5 μ l ekstrakta DNK na 25 μ l reakcijske smjese u sterilne tube za PCR.

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

6.2.5. Stavite tube u uređaj za PCR (thermal cycler) koji je korišten u preliminarnom testiranju te pokrenite optimizirani PCR program (Dodatak 6).

6.3. Analiza PCR produkata

6.3.1. Elektroforezom u agaroznom gelu razdvojite umnožene PCR produkte. Najmanje 12 μ l reakcijske smjese umnožene DNK iz svakog uzorka, pomiješane s 3 μ l pufera za nanošenje (Dodatak 6), nanosite u 2%-tni (w/v) agarozni gel u tris-acetat EDTA puferu (TAE) (Dodatak 6), uz napon od 5 do 8 V po cm. Uporabite odgovarajući DNK dužinski standard, npr. 100 bp.

6.3.2. Obojite elektroforetske pruge DNK u gelu etidijum bromidom (0,5 mg/l) 30 do 45 minuta poduzimajući pri tome odgovarajuće mjere opreza za rad s ovim mutagenom.

6.3.3. Obojeni gel pregledajte na kratkovalnom UV transiluminatoru (npr. $\lambda = 302 \text{ nm}$) i tražite umnožene fragmente očekivane duljine (Dodatak 6) te ih dokumentirajte.

6.3.4. Za svaki novi nalaz/slučaj provjerite autentičnost umnoženog PCR produkta analizom restrikcijskim enzimima preostale umnožene DNK uzorka i to inkubacijom pri optimalnoj temperaturi i u optimalnom vremenu s odgovarajućim enzimom i puferom (vidi Dodatak 6). Pocijepane fragmente razdvojite elektroforezom u agaroznom gelu kako je gore navedeno te nakon bojenja etidijum bromidom na UV transiluminatoru promatrajte karakteristični restrikcijski obrazac i usporedite ga s pozitivnom kontrolom prije i poslije cijepanja.

Tumačenje rezultata PCR testa:

PCR test je negativan ako u testiranom uzorku nije vidljiv PCR produkt očekivane duljine koji je specifičan za bakteriju *C. m. ssp. sepedonicus*, ali je vidljiv u svim pozitivnim kontrolnim uzorcima (kod multipleks PCR-a s prajmerama za unutarnju kontrolu koje su specifične za biljku domaćina: u testiranom se uzorku mora umnožiti drugi produkt PCR-a očekivane veličine).

PCR test je pozitivan ako je vidljiv PCR produkt koji je specifičan za bakteriju *C. m. ssp. sepedonicus* i koji je očekivane duljine i restrikcijskog obrasca, pod uvjetom da nije umnožen u nijednom uzorku negativne kontrole. Pouzdanu potvrdu pozitivnog rezultata možete dobiti i ponavljanjem testa s drugim parom prajmera (Dio 9.3).

Napomena:

Može se sumnjati da je došlo do inhibicije PCR reakcije ako se iz uzorka pozitivne kontrole koji sadrži *C. m. ssp. sepedonicus* u vodi dobije očekivani produkt, a iz pozitivnih kontrola s *C. m. ssp. sepedonicus* u ekstraktu krumpira dobiju negativni rezultati. U multipleks PCR protokolima s unutarnjim kontrolama, inhibicija reakcije je indicirana ako nije dobiven niti jedan od dva produkta.

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

7. BIOTEST

Napomena:

Preliminarno testiranje ovom metodom treba omogućiti ponovljivu detekciju 10^3 do 10^4 jedinica koje stvaraju kolonije (CFU) bakterije *C. m. ssp. sepedonicus* po ml, a koje su dodane ekstraktima uzoraka koji su u ranijem testiranju bili negativni (za pripremu vidi Dodatak 2).

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

Neke sorte patlidžana su odlične kao selektivni medijum za rast *C. m. ssp. sepedonicus*, čak i kad nema simptoma, a ujedno su i odlične kao domaćini za test potvrde.

Uvjeti rasta trebaju biti optimalni kako bi se smanjio rizik od lažno negativnih rezultata.

Za detalje o uzgoju vidi Dodatak 8.

7.1. Na patlidžane rasporedite sav preostali alikvot resuspendiranog taloga ostavljen za testiranje iz dijela 3.1.6 ili 3.2.5 jednom od metoda koje su navedene niže u tekstu (7.3 ili 7.4). Koristite samo biljke u stadiju dva do tri prava lista, do potpune razvijenosti trećeg pravog lista. Kako bi se u potpunosti iskoristio resuspendirani talog te osigurala djelotvorna

inokulacija, za postupke navedene niže u tekstu bit će potrebno 15 do 25 biljaka patlidžana po jednom uzorku.

7.2. Nemojte zalijevati patlidžane jedan do dva dana prije inokulacije kako bi se smanjio turgor.

7.3. Inokulacija zarezivanjem

7.3.1. Držeći biljku među prstima, pipetom nanosite kapljicu (oko 5-10 μ l) resuspendiranog taloga na stabljiku između kotiledona i prvog lista.

7.3.2. Sterilnim skalpelom napravite dijagonalni rez, dug oko 1 cm i dubok oko 2/3 debljine stabljike, počevši od nanešene kapljice resuspendiranog taloga.

7.3.3. Čvrsto zatvorite rez sterilnim vazelinom iz štrcaljke.

7.4. Inokulacija injekcijom

Inokulirajte stabljike patlidžana neposredno iznad kotiledona injekcijom s potkožnom iglom (najmanje 23G). Uzorak rasporedite na testne patlidžane.

7.5. Za pozitivnu kontrolu, inokulirajte 5 biljaka suspenzijom u vodi od 10^5 do 10^6 stanica po ml poznate kulture *C. m. ssp. sepedonicus* i, kada je moguće, ekstraktom prirodno zaraženih tkiva krtola (vidi Dio 4) istom metodom inokulacije (7.3 ili 7.4).

7.6. Za negativnu kontrolu, inokulirajte 5 biljaka sterilnim puferom za talog istom metodom inokulacije (7.3 ili 7.4).

7.7. Uzgajajte biljke u karantenskim prostorijama do četiri tjedna na 18 do 24°C, uz dovoljnu količinu svjetla i visoku vlagu (70 do 80%) i primjereno zalijevajte kako bi spriječili nakupljanje vode ili uvenuće zbog nedostatka vode. Stanice *C. m. ssp. sepedonicus* ugibaju na temperaturama iznad 30°C, a optimalna temperatura je 21°C. Kako bi izbjegli unakrsnu kontaminaciju, biljke pozitivne i negativne kontrole uzgajajte na jasno odvojenim stolovima u stakleniku ili policama u komori za rast ili, u slučaju da je prostor ograničen, pobrinite se da su strogo odvojene između pojedinih postupaka. Ako se biljke za različite uzorke moraju uzgajati blizu jedna drugoj, razdvojite ih prikladnim zaslonima. Kod prihrane, zalijevanja, pregledavanja i svakog drugog postupka s biljkama dobro pazite da ne dođe do unakrsne kontaminacije. Od ključne je važnosti da u staklenicima i komorama za uzgoj ne bude nikakvih kukaca jer oni mogu prenijeti bakteriju s uzorka na uzorak.

7.8. Nakon jednog tjedna redovito provjeravajte pojavu simptoma. Prebrojite biljke koje pokazuju simptome. *C. m. ssp. sepedonicus* uzrokuje venuće lišća kod patlidžana koje može početi kao uvelost rubova ili između žila listova. Uvenulo tkivo može u početku izgledati tamnozeleno ili prošarano, ali postaje blijedo prije nego što postane nekrotično. Uvenulost između lisnih žila često izgleda masno, kao da su natopljeni vodom. Nekrotično tkivo često ima svjetložuti rub. Biljke ne ugibaju uvijek; što je rano prije nego što se simptomi razviju dulje, to je veća mogućnost preživljavanja. Biljke mogu prerasti zarazu. Mlade biljke patlidžana mnogo su osjetljivije na niske koncentracije *C. m. ssp. sepedonicus* nego starije biljke; zbog toga se koriste biljke u ili neposredno prije faze tri prava lista.

Uvenuće može biti uzrokovano populacijama drugih bakterija ili gljiva koje su prisutne u ekstraktu tkiva gomolja. To su: *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* i *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*, *Erwinia chrysanthemi*, *Phoma exigua* var. *foveata*, kao i širok spektar saprofitnih bakterija. Posebice *Erwinia chrysanthemi* može uzrokovati simptome na listovima i venuće koje je vrlo slično simptomima koje prouzrokuje *C. m. ssp. sepedonicus*. Jedina razlika je crnjenje stabljika u slučaju infekcija bakterijom *Erwinia chrysanthemi*. Druga venuća mogu se razlikovati od onih koje uzrokuje *C. m. ssp. sepedonicus* zato što cijeli listovi ili cijele biljke vrlo brzo venu. Može se pripremiti i bojenje po Gramu: time će se razlučiti *C. m. ssp. sepedonicus* od *Erwinia* spp.

7.9. Čim primijetite simptome kod patlidžana, potrebno je ponovno izvršiti izolaciju, koristeći dijelove uvenulog tkiva lišća ili tkiva stabljike (vidi 3.1.3 za maceraciju tkiva). Površinski dezinficirajte lišće i stabljike patlidžana tako da ih obrišete 70%-tnim etanolom. Provedite IF ili PCR test na soku patlidžana i izolirajte na prikladnoj (selektivnoj) hranjivoj podlozi (vidi Dio 8). Može se pripremiti i bojenje po Gramu (Dodatak 9). Identificirajte prečišćene kulture za koje se pretpostavlja da su *C. m. ssp. sepedonicus* i potvrdite patogenost (vidi Dio 9 i 10).

7.10. U određenim okolnostima, posebice kad uvjeti za rast nisu optimalni, moguće je da *C. m. ssp. sepedonicus* postoji kao latentna infekcija u patlidžanima čak i nakon razdoblja inkubacije do 4 tjedna. Ako se simptomi ne primijete nakon 4 tjedna, provedite IF/PCR test na sastavljenom uzorku dijelova stabljike od 1 cm svake testne biljke, uzetih iznad mjesta inokulacije. Ako je test pozitivan, potrebno je provesti ponovnu izolaciju na prikladnoj (selektivnoj) hranjivoj podlozi, prema postupku iz Dijela 8. Identificirajte prečišćene kulture za koje se pretpostavlja da su *C. m. ssp. sepedonicus* i potvrdite patogenost (vidi Dio 9 i 10).

Tumačenje rezultata biotesta

Rezultati biotesta su prihvatljivi ako biljke pozitivne kontrole pokazuju tipične simptome, ako se iz tih biljaka može ponovno izdvojiti bakterija, i ako se na negativnim kontrolama ne pronađu nikakvi simptomi.

Biotest je negativan ako testne biljke nisu zaražene bakterijom *C. m. ssp. sepedonicus*, pod uvjetom da je bakterija *C. m. ssp. sepedonicus* detektirana u pozitivnim kontrolama.

Biotest je pozitivan ako su testne biljke zaražene bakterijom *C. m. ssp. sepedonicus*.

8. IZOLACIJA *C. m. ssp. sepedonicus*

Napomena:

Dijagnoza se može potvrditi samo ako se *C. m. ssp. sepedonicus* izolira i zatim identificira (vidi Dio 9), te ako se potvrdi patogenost (Dio 10). Iako je *C. m. ssp. sepedonicus* fastidiozna bakterija, može se izolirati iz tkiva sa ispoljenim simptomima.

Međutim, mogu ga prerasti brzo rastuće saprofitne bakterije te su stoga izolacije izravno iz ekstrakta tkiva krtola ili stabljike teške (Dio 3.1.6 ili 3.2.5). Selektivnom hranjivom podlogom i prikladno razrijeđenom otopinom resuspendiranog taloga iz isječaka ili stabljika krumpira moguća je izravna izolacija *C. m. ssp. sepedonicus*.

Izolacije je potrebno izvršiti iz svih gomolja ili dijelova stabljike krumpira sa simptomima te iz vještački inokuliranih biljaka patlidžana kod kojih nisu primijećeni simptomi ali je IF/PCR test iz sastavljenog uzorka bio pozitivan (vidi Dio 7.10). Maceriranje stabljika patlidžana treba se, prema potrebi, provoditi kao što je navedeno u Dijelu 3.1.3.

Za pozitivne kontrole, pripremite decimalna razrijeđenja suspenzije 10^6 cfu po ml *C. m. ssp. sepedonicus* (npr. NCPPB 4053 ili PD 406). Kako bi izbjegli svaku mogućnost kontaminacije, pripremite pozitivne kontrole potpuno odvojeno od uzoraka koji se testiraju.

Za svaku svježe pripremljenu seriju selektivne hranjive podloge potrebno je provjeriti njenu prikladnost za rast patogena prije nego što se uporabi za testiranje rutinskih uzoraka.

Testirajte kontrolni materijal na isti način kao i uzorak ili uzorke.

8.1. Uzgoj na selektiranoj hranjivoj podlozi

8.1.1. Iz 100 μ l alikvota iz uzorka resuspendiranog taloga krumpira ili biljnog soka patlidžana pripremite decimalna razrijeđenja u puferu za talog (Dodatak 3).

8.1.2. Izolacija iz nerazrijeđenog resuspendiranog taloga krumpira obično ne uspije zbog teškog uzgoja *C. m. ssp. sepedonicus* i kompeticije saprofita. Obzirom da je bakterija obično prisutna u visokim populacijama u zaraženom tkivu, saprofiti se obično mogu odstraniti razrjeđivanjem, dok patogen ostaje. Stoga se preporuča razmazati 100 μ l iz svakog

uzorka (kod uporabe Petri kutija promjera 90 mm – prilagodite količinu za Petri kutije drugih veličina), 1/100 do 1/10000 razrijeđene suspenzije na hranjivu podlogu MTNA ili na NCP-88 (Dodatak 5), tehnikom razmaza.

Napomena:

Alternativna strategija je da razmažete početni alikvot po 100 µl resuspendiranog taloga krumpira na prvu podlogu, a zatim istim štapićem napravite razmaz na drugu podlogu, pri čemu na drugu podlogu nanosite ostatke ekstrakta s prve podloge. Na kraju to ponovite s trećom podlogom, čime dobivate sličan efekt razrjeđenja.

8.1.3. Inkubirajte podloge u mraku pri 21 do 23°C.

8.1.4. Prva provjera podloga i procjena kolonija sličnih *C. m. ssp. sepedonicus*, u poređenju s kontrolnim podlogama, je nakon 3 dana, a daljnje procjene nakon 5, 7, te eventualno 10 dana.

8.2. Prečišćavanje sumnjivih kolonija

Napomena:

Kolonije slične *C. m. ssp. sepedonicus* treba precijepiti na hranjivu podlogu YGM ako će se koristiti za inokulaciju patlidžana i/ili daljnju identifikaciju; to se treba učiniti prije nego podloge postanu previše zaraštene, odnosno najbolje nakon tri do pet dana.

8.2.1. Razmažite kolonije slične *C. m. ssp. sepedonicus* na jednu od slijedećih hranjivih podloga: (sastavi su navedeni u Dodatku 5):

- hranjivi agar s dodatkom dekstroze (koristi se samo za precjepljivanje)
- agar s dodatkom kvasca, peptona i glukoze,
- agar s dodatkom ekstrakta kvasca i mineralnih soli.

Inkubirajte na 21°C do 24°C do 10 dana.

C. m. ssp. sepedonicus sporo raste, obično stvara kremaste, kupolaste kolonije sa šiljatim vrhom unutar 10 dana.

8.2.2. Ponovno razmažite kako bi postigli čistoću.

Stopa rasta se poboljšava presijavanjem. Tipične kolonije su kremasto-bijele ili poput slonovače, ponekad žute, zaokružene, glatke, povišene, konveksno-kupolaste, sluzavo-tekuće, s cijelim rubovima i obično 1 do 3 mm u promjeru.

Jednostavno bojenje po Gramu (Dodatak 9) može pomoći pri odabiru kolonija za daljnje testiranje.

8.2.3. Identificirajte vjerojatne kulture (vidi Dio 9) i provedite test patogenosti (vidi Dio 10).

9. IDENTIFIKACIJA

Identificirajte čiste kulture izolata za koje se prepostavlja da su *C. m. ssp. sepedonicus* uporabom najmanje dva od slijedećih testova koja se temelje na različitim biološkim načelima.

Uključite poznate referentne sojeve za svaki test.

9.1. Nutritivni i enzimatski testovi za identifikaciju

Odredite slijedeća fenotipska svojstva koja su univerzalno prisutna ili odsutna kod bakterije *C. m. ssp. sepedonicus*, prema metodama iz Lelliott i Stead (1987), Klement i sar. (1990), Schaad (2001), nepoznati autor (1987).

Sve se hranjive podloge trebaju inkubirati na 21°C i pregledati nakon šest dana. Ako ne dođe do rasta, inkubirajte do 20 dana.

U sve testove treba uključiti poznati kontrolni izolat *C. m. ssp. sepedonicus*. Nutritivni i fiziološki testovi trebaju se provesti koristeći kulture s hranjivog agara. Morfološka poređenja trebaju se napraviti iz kultura na hranjivom agaru s dodatkom dekstroze.

Testovi	Očekivani rezultati
Test oksidacije/fermentacije (O/F)	inertan ili slabo oksidativan
Aktivnost oksidaze	–
Rast na 37 °C	–
Aktivnost ureaze	–
Hidroliza eskulina	+
Hidroliza skroba	– ili slaba
Tolerancija 7% otopine NaCl	–
Stvaranje indola	–
Aktivnost katalaze	+
Stvaranje H ₂ S	–
Iskorištavanje citrata	–
Likvefikacija želatine	–
Kiselina iz glicerola	–
Kiselina iz laktoze	– ili slaba
Kiselina iz ramnoze	–
Kiselina iz salicina	–
Bojenje po Gramu (Dodatak 9)	+

9.2. IF test

- Pripremite suspenziju od približno 10⁶ stanica po ml u IF puferu (Dodatak 3).
- Pripremite dvostruka razrjeđenja otopine prikladnog antiseruma.
- Primijenite IF postupak (Dio 4).
- IF test je pozitivan ako je IF titar kulture jednak titru pozitivne kontrole.

9.3. PCR test

- Pripremite suspenziju od približno 10⁶ stanica po ml u ultra čistoj vodi.
- Zagrijte 100 µl stanične suspenzije u zatvorenim tubama u bloku za zagrijavanje ili vrelom vodenom kupatilu četiri minute pri 100°C. Prema potrebi, dodavanje svježe pripremljenog NaOH do konačne koncentracije 0,05M može pomoći liziji stanica. Uzorci se mogu potom, do uporabe, pohraniti na –16 do –24°C.
- Uporabite prikladne PCR postupke za umnožavanje specifičnih fragmenata *C. m. ssp. sepedonicus* (npr. Pastrik, 2000; vidi Dodatak 4; Li i de Boer, 1995; Mills i sar., 1997; Pastrik i Rainey, 1999; Schaad i sar., 1999.)

- (d) Identifikacija *C. m. ssp. sepedonicus* je pozitivna ako su PCR produkti iste veličine i imaju istu duljinu restrikcijskih fragmenata polimorfizma kao i pozitivni kontrolni soj.

9.4. Test FISH

- (a) Pripremite suspenziju od približno 10^6 stanica po ml u ultra čistoj vodi.
(b) Primijenite FISH postupak (Dio 5).
(c) FISH test je pozitivan ako su postignute iste reakcije iz kulture i pozitivne kontrole.

9.5. Profiliranje masnih kiselina (FAP)

- (a) Uzgajajte kulturu na triptikaza-sojinom-agaru (Oxoid) 72 sata pri 21°C (+/- 1°C).
(b) Primijenite prikladan FAP postupak (Janse, 1991; Stead, 1992).
(c) FAP test je pozitivan ako je profil testiranog izolata identičan profilu pozitivne kontrole. Prisutnost karakterističnih masnih kiselina: 15:1 Anteiso A, 15:0 Iso, 15:0 Anteiso, 16:0 Iso, 16:0 i 17:0 Anteiso, u velikoj mjeri ukazuje na *C. m. ssp. sepedonicus*. Drugi rodovi kao što su *Curtobacterium*, *Arthrobacter* i *Micrococcus* također imaju neke od ovih kiselina, ali 15:1 Anteiso A je rijetka kiselina u tim bakterijama, ali se pojavljuje u svim bakterijama iz roda *Clavibacter* između 1 do 5%. Kod *C. m. ssp. sepedonicus* vrijednost je obično oko 5%.

9.6. BOX-PCR

- (a) Pripremite suspenziju od približno 10^6 stanica po ml u ultra čistoj vodi.
(b) Primijenite test sukladno s postupkom (Smith i sar., 2001).

10. TEST POTVRDE

Test patogenosti mora se provesti kao konačna potvrda dijagnoze *C. m. ssp. sepedonicus* i za procjenu virulentnosti kultura identificiranih kao *C. m. ssp. sepedonicus*:

10.1. Pripremite inokulum od približno 10^6 stanica po ml iz trodnevnih kultura izolata koji se testira i prikladan izolat pozitivne kontrole *C. m. ssp. sepedonicus*.

10.2. Inokulirajte stabljike 5 do 10 mladih biljaka patlidžana u fazi 3 prava lista (Dio 7.3 ili 7.4).

10.3. Inkubirajte inokulirane biljke patlidžana pri 18 do 24°C uz dovoljnu količinu svjetla i visoku relativnu vlagu te prikladno zalijevajte kako bi izbjegli nakupljanje vode ili stres od suše (Dio 7.7). Kod čistih kultura, tipično bi se venuće trebalo pojaviti u roku od dva tjedna, ali biljke koje ne pokazuju simptome (vidi Dio 7.8) nakon tog vremena trebaju se inkubirati do tri tjedna na temperaturama koje su povoljne za rast patlidžana, ali ne više od 25°C (Dodatak 8). Ako simptomi nisu prisutni ni nakon tri tjedna, kultura se ne može potvrditi kao patogeni oblik *C. m. ssp. sepedonicus*.

10.4. Izolirajte patogena iz biljaka sa simptomima tako da odstranite dio stabljike 2 cm iznad mjesta inokulacije. Usitnite i suspendirajte u maloj količini sterilne destilirane vode ili 50 mM fosfatnog pufera (Dodatak 3). Izolirajte bakterije iz suspenzije razmazom na MTNA i YPGA (Dodatak 5), inkubirajte tri do pet dana pri 21 do 23°C i pregledajte jesu li se razvile tipične kolonije bakterije *C. m. ssp. sepedonicus*.

Dodatak 1

Laboratoriji koji su uključeni u optimizaciju i validaciju protokola

Laboratorij ¹	Lokacija	Država
Agentur für Gesundheit und	Beč i Linz	Austrija

Ernährungssicherheit		
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Belgija
Plantedirektoratet	Lyngby	Danska
Central Science Laboratory	York	Engleska
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburgh	Škotska
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	Francuska
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Francuska
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Njemačka
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Njemačka
State Laboratory	Dublin	Irska
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Nizozemska
Norwegian Crop Research Institute, Plant Protection Centre	Ås	Norveška
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lisbon	Portugal
Nacionalni inštitut za biologijo	Ljubljana	Slovenija
Centro de Diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	Španjolska
¹ Za kontakt s znanstvenicima vidi mrežnu stranicu.		

Dodatak 2

Priprema pozitivnih i negativnih kontrola za osnovne testove provjere, PCR/IF i FISH

- Uzgojite čistu kulturu virulentnog soja bakterije *C. m. ssp. sepedonicus* starosti 72 sata (NCPBP 4053 ili PD 406) na MTNA osnovnoj hranjivoj podlozi i suspendirajte u 10 mM fosfatnom puferu da dobijete gustoću stanica od približno 1 do 2×10^8 cfu po ml. To je obično slabo mutna suspenzija optičke gustoće od 0,20 pri 600 nm.
- Izvadite isječke iz 200 gomolja krumpira sorte s bijelom korom za koje je poznato da nisu zaraženi bakterijom *C. m. ssp. sepedonicus*.
- Obradite isječke uobičajenom metodom i resuspendirajte talog u 10 ml.
- Pripremite 10 sterilnih mikrotuba od 1,5 ml s 900 µl resuspendiranog taloga.
- U prvu mikrotubu dodajte 100 µl suspenzije *C. m. ssp. sepedonicus*. Promiješajte na vortex miješalici.
- U slijedećih pet mikrotuba pripremite decimalna razrjeđenja.
- Ovih šest mikrotuba s kontaminiranim ekstraktom koristite za pozitivnu kontrolu. Četiri mikrotube s nekontaminiranim ekstraktom koristite za negativnu kontrolu. Sukladno s tim, označite mikrotube.
- Pripremite alikvote od 100 µl u mikrotubama od 1,5 ml tako da dobijete devet preslika svakog kontrolnog uzorka. Do uporabe ih pohranite na -16 do -24°C .

- Prisutnost i količinu *C. m. ssp. sepedonicus* u kontrolnim uzorcima potvrdite najprije IF testom.
- Za PCR test, obavite ekstrakciju DNK na pozitivnim i negativnim kontrolnim uzorcima za svaku seriju uzoraka za testiranje.
- Za IF i FISH testove, obavite testove na pozitivnim i negativnim kontrolnim uzorcima za svaku seriju uzoraka za testiranje.
- Kod IF, FISH i PCR testova, bakterija *C. m. ssp. sepedonicus* se mora detektirati u najmanje 10^6 i 10^4 stanica/ml pozitivnih kontrola i niti u jednoj negativnoj kontroli.

Dodatak 3

Puferi za postupke testiranja

Napomena:

Neotvoreni sterilizirani puferi mogu se čuvati do jedne godine.

1. Puferi za postupak ekstrakcije

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

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

- Na_2HPO_4 (bezvodni) 4,26 g
- KH_2PO_4 2,72 g
- Destilirana voda 1 l

Otopite sastojke, provjerite pH i sterilizirajte u autoklavu pri 121°C 15 minuta.

Mogu biti korisni i slijedeći dodatni sastojci:

	Namjena	Količina (po l)
Pahuljice Lubrol	Deflokulant*	0,5 g
DC silikon protiv pjenjenja	sredstvo protiv pjenjenja *	1,0 ml
Tetranatrijev pirofosfat	Antioksidans	1,0 g
Polivinilpirolidon-40000 (PVP-40)	Vezanje PCR inhibitora	50 g
*Za uporabu kod metode ekstrakcije homogenizacijom		

1.2. Pufer za talog (10 mM fosfatni pufer, pH 7,2)

Ovaj se pufer koristi za resuspendiranje i razrjeđivanje ekstrakta isječaka gomolja krumpira, nakon koncentriranja u talog centrifugiranjem.

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ 2,7 g
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0,4 g
- Destilirana voda 1 l

Otopite sastojke, provjerite pH i sterilizirajte u autoklavu pri 121°C 15 minuta.

2. Puferi za IF test

2.1. IF pufer (10 mM fosfatni pufer s dodatkom soli (PBS), pH 7,2)

Ovaj se pufer koristi za razrjeđivanje antitijela.

- Na₂HPO₄·12H₂O 2,7 g
- NaH₂PO₄·2H₂O 0,4 g
- NaCl 8,0 g
- Destilirana voda 1.0 L

Otopite sastojke, provjerite pH i sterilizirajte u autoklavu pri 121°C 15 minuta.

2.2. IF pufer – Tween

Ovaj se pufer koristi za ispiranje stakalca.

IF puferu dodajte 0,1% Tween 20.

2.3. Glicerol s fosfatnim puferom, pH 7,6

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

- Na₂HPO₄·12H₂O 3,2 g
- NaH₂PO₄·2H₂O 0,15 g
- Glicerol 50 ml
- Destilirana voda 100 ml

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

Dodatak 4

Određivanje stupnja kontaminacije u IF i FISH testovima

1. Odredite središnji broj tipičnih fluorescentnih stanika po vidnom polju (c)
2. Izračunajte broj tipičnih fluorescentnih stanika po otvoru mikroskopskog stakalca (C)

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

gdje je

S = površina otvora stakalca s više otvora, i

s = površina polja objektiva.

$$s = \pi i^2 / 4G^2K^2$$

gdje je

i = koeficijent polja (varira od 8 do 24 ovisno o tipu okulara)

K = koeficijent tubusa (1 ili 1,25)

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

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

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

gdje je

y = volumen resuspendiranog taloga na svakom oknu, i

F = faktor razrjeđenja resuspendiranog taloga.

Dodatak 5

Hranjive podloge za izolaciju i uzgoj *C. m. ssp. sepedonicus*

(a) Opće hranjive podloge

Hranjivi agar (NA)

- Hranjivi agar (Difco) 23,0 g
- Destilirana voda 1,0 L
- Otopite sastojke i sterilizirajte u autoklavu pri 121°C 15 minuta.

Hranjivi agar s dekstrozom (NDA)

- Difco bacto hranjivi agar koji sadrži 1% D(+) glukoze (monohidrata). Sterilizirajte u autoklavu pri 115°C 20 minuta.

Agar s kvascem, peptonom i glukozom (YPGA)

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

Otopite sastojke i sterilizirajte u autoklavu pri 121°C 15 minuta.

Agar s ekstraktom kvasca i mineralnim solima (YGM)

- Bacto ekstrakt kvasca (Difco) 2,0 g
- D(+) glukoza (monohidrat) 2,5 g
- K_2HPO_4 0,25 g
- KH_2HPO_4 0,25 g
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 g
- $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0,015 g
- NaCl 0,05 g
- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,005 g
- Bacto agar (Difco) 18 g
- Destilirana voda 1,0 L

Otopite sastojke i sterilizirajte 0,5 litara volumena hranjive podloge u autoklavu pri 121°C 15 minuta.

(b) Validirane selektivne hranjive podloge

MTNA

Osim ako nije drugačije navedeno, svi sastojci su iz BDH.

- Ekstrakt kvasca (Difco) 2,0 g
- Manitol 2,5 g
- K_2HPO_4 0,25 g
- KH_2HPO_4 0,25 g
- NaCl 0,05 g
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 g
- $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0,015 g
- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,005 g
- Agar (Oxoid br. 1) 16,0 g
- Destilirana voda 1,0 L

Otopite sastojke, podesite pH na 7,2. Nakon sterilizacije u autoklavu (pri 121°C 15 minuta) i hlađenja na 50°C, dodajte antibiotike: trimetoprim 0,06 g, nalidiksičnu kiselinu 0,002 g, amfotericin B 0,01 g.

Osnovne otopine antibiotika: trimetoprim (Sigma) i nalidiksična kiselina (Sigma) (oboje na 5 mg/ml), u 96%-tnom metanolu, amfotericin B (Sigma) (1 mg/ml) u dimetilsulfoksidu. Osnovne otopine su sterilirane filtriranjem.

Napomena:

Rok trajanja osnovne hranjive podloge je tri mjeseca. Nakon što se dodaju antibiotici, rok trajanja je jedan mjesec kada se čuva u hladnjaku.

NCP-88

- Hranjivi agar (Difco) 23 g
- Ekstrakt kvasca (Difco) 2 g
- D-manitol 5 g
- K₂HPO₄ 2 g
- KH₂PO₄ 0,5 g
- MgSO₄·7H₂O 0,25 g
- Destilirana voda 1,0 L

Otopite sastojke, podesite pH na 7,2. Nakon sterilizacije u autoklavu (na 121°C 15 minuta) i hlađenja na 50°C, dodajte slijedeće antibiotike: Polimiksin B sulfat (Sigma) 0,003 g, nalidiksičnu kiselinu (Sigma) 0,008 g, Cikloheksimid (Sigma) 0,2 g.

Pripremite osnovne otopine antibiotika: nalidiksična kiselina u 0,01 M NaOH, cikloheksimid u 50% etanolu, polimiksin B sulfat u destiliranoj vodi. Osnovne otopine su sterilirane filtriranjem.

Napomena:

Rok trajanja osnovne hranjive podloge je tri mjeseca. Nakon što se dodaju antibiotici, rok trajanja je jedan mjesec kada se čuva u hladnjaku.

Dodatak 6

Validirani protokoli i reagensi za PCR

Napomena:

Preliminarna testiranja trebaju omogućiti ponovljivu detekciju 10³ do 10⁴ stanica bakterije *C. m. ssp. sepedonicus* po ml ekstrakta uzorka.

Preliminarna testiranja ne smiju dati lažno pozitivne rezultate kod određenih odabranih bakterijskih sojeva.

1. Protokol za multipleks PCR s unutarnjom PCR kontrolom (Patrik, 2000)

1.1. Oligonukleotidni prajmeri

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

Očekivana duljina umnoženog produkta ciljane DNK *C. m. ssp. sepedonicus* = 502 bp (par prajmera PSA).

Očekivana duljina umnoženog produkta iz 18S rRNA unutarnje kontrole = 377 bp (par prajmera NS).

1.2. Reakcijska smjesa za PCR

Reagens	Količina po reakciji	Konačna koncentracija
Sterilna ultra čista voda	15,725 µl	
10x PCR pufer ¹ (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1x (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (frakcija V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
Smjesa d-NTP (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM

Prajmera PSA-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Prajmera PSA-R (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Prajmera NS-7-F (10 µM) ²	0,1 µl	0,04 µM
Prajmera NS-8-R (10 µM) ²	0,1 µl	0,04 µM
Taq polimeraza (5 U/µl) ¹	0,2 µl	1,0 U
Volumen uzorka	5,0 µl	
Ukupni volumen	25,0 µl	

¹Metoda je bila validirana Taq polimerazom iz Perkin Elmer (AmpliTaq ili Gold) i Gibco BRL.

²Koncentracija prajmera NS-7 F i NS-8-R je bila optimizirana za ekstrakciju jezgre pupka krumpira metodom homogenizacije i prečišćavanja DNK prema Pastroku (2000) (vidi dio 6.1.a i 6.2). Ponovna optimizacija koncentracija reagensa bit će potrebna ako se uporabi ekstrakcija tresanjem ili druga metoda izolacije DNK.

1.3. Uvjeti PCR reakcije

Izvedite sljedeći program:

- 1 ciklus: (i) 3 minute pri 95°C (denaturacija ciljane DNK)
- 10 ciklusa: (ii) 1 minutu pri 95°C (denaturacija ciljane DNK)
- (iii) 1 minuta pri 64°C (sparivanje prajmera i ciljane DNK)
- (iv) 1 minuta pri 72°C (produljivanje kopije)
- 25 ciklusa: (v) 30 sekundi pri 95°C (denaturacija ciljane DNK)
- (vi) 30 sekundi pri 62°C (sparivanje prajmera i ciljane)
- (vii) 1 minuta pri 72°C (produljivanje kopije)
- 1 ciklus: (viii) 5 minuta pri 72°C (konačno produljivanje)
- (ix) držati pri 4°C.

Napomena:

Ovaj je program optimiziran za uporabu s uređajem za PCR MJ Research PTC 200. Kod uporabe s drugim modelima vjerojatno će biti potrebno prilagoditi trajanje ciklusa (ii), (iii) (iv), (v), (vi) i (vii).

1.4. Analiza produkta umnožavanja restrikcijskim enzimom

PCR produkti umnoženi iz DNK bakterije *C. m. ssp. sepedonicus* daju karakteristični obrazac dužine restrikcijskih fragmenata polimorfizma s enzimom Bgl II nakon inkubacije pri 37°C 30 minuta. Restrikcijski fragmenti dobiveni iz specifičnoga fragmenta *C. m. ssp. sepedonicus* su veličine 282 bp i 220 bp.

2. Priprema pufere za nanošenje

2.1. Bromfenol plavilo (10%-tna osnovna otopina)

- Bromfenol plavilo 5 g
- Destilirana voda (bidestilirana) 50 ml

2.2. Puffer za nanošenje

- Glicerol (86%) 3,5 ml
- Bromfenol plavilo (5.1) 300 µl
- Destilirana voda (bidestilirana) 6,2 ml
- 10x Tris acetatni EDTA puffer (TAE), pH 8,0
- Tris puffer 48,4 g
- Ledena ocatna kiselina 11,42 ml

- EDTA (dinatrijeva so) 3,72 g
 - Destilirana voda 1,00 L
- Razrijedite do 1× prije uporabe.
Dostupan je i na tržištu (npr. Invitrogen ili jednakovrijedan).

Dodatak 7

Validirani reagensi za FISH test

1. Oligo-probe

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

2. Otopina za fiksiranje

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

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

(ii) Podesite pH na 7,0 dodajući 1 ml 0,1M fosfatnog pufera (PB; pH 7,0) i 5 kapi 1N HCl. Indikatorskim papirom provjerite vrijednost pH i ako je potrebno podesite je pomoću HCl ili NaOH.

(UPOZORENJE! U OTOPINAMA S PARAFORMALDEHIDOM NE UPORABLJAVAJTE pH METAR)

(iii) Profiltrirajte otopinu kroz membranski filter od 0,22 µm te je do daljnje uporabu pohranite na 4°C i zaštitite od prašine.

(iv) Napomena:

Alternativna otopina za fiksiranje: 96%-tni etanol.

3. 3x Hybmix

- NaCl 2,7 M
 - Tris-HCl 60 mM (pH 7,4)
 - EDTA (sterilizirana filtriranjem i u autoklavu) 15 mM
- Razrijedite do 1x prema potrebi.

4. Otopina za hibridizaciju

- 1x Hybmix
- Natrijev dodecil sulfat (SDS) 0,01 %
- Proba EUB 338 5 ng/µl
- Proba CMSCY301 5 ng/µl

Pripremite količine otopine za hibridizaciju prema izračunima u tab. 1. Za svako stakalce (s 2 različita uzorka u duplikatu) treba 90 µl otopine za hibridizaciju.

Tab. 1: Predložene količine za pripremanje smjese za hibridizaciju

	2 stakalca	8 stakalca
Sterilna ultra čista voda	50,1	200,4
3x hybmix	30,0	120,0
1 % SDS	0,9	3,6

Proba EUB 338 (100 ng/μl)	4,5	18,0
Proba CMSCY301 (100 ng/μl)	4,5	18,0
Ukupni volumen (μl)	90,0	360,0

Napomena:

Pohranite sve otopine koje sadrže oligo-probe osjetljive na svjetlost u mraku pri – 20°C. Zaštitite od izravne sunčeve svjetlosti ili električne rasvjete tijekom uporabe.

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

- Na₂HPO₄ 8,52 g
- KH₂PO₄ 5,44 g
- Destilirana voda 1,00 L

Otopite sastojke, provjerite pH i sterilirajte u autoklavu pri 121°C 15 minuta.

Dodatak 8

Uzgoj patlidžana

Posijte sjeme patlidžana (*Solanum melongena*) u pasteriziranom kompostu za sjeme. Presadite sadnice s potpuno razvijenim kotiledonima (10 do 14 dana) u pasteriziran kompost za lončanice.

Patlidžani se trebaju uzgajati u stakleniku pod slijedećim uvjetima:

- Duljina dana: 14 sati ili prirodna duljina dana, ako je dulja;
- Temperatura:
 - dan: 21 do 24°C,
 - noć: 15°C.
- Osjetljive sorte patlidžana:
 - »Black Beauty«,
 - »Long Tom«,
 - »Rima«,
 - »Balsas«

Dodatak 9

Postupak bojenja po Gramu (Huckerova modifikacija) (Doetsch, 1981)

Rastvor kristal violeta

- Otopite 2 g kristal violeta u 20 ml 95%-tnog etanola.
 - Otopite 0,8 g amonij-oksalata u 80 ml destilirane vode.
- Pomiješajte dvije otopine.

Rastvor Lugola

Jod 1 g

Kalij-jodid 2 g

Destilirana voda 300 ml

Usitnite zajedno koristeći tučak i avan. Dodajte vodi i promućkajte da se otopi u zatvorenoj posudi.

Rastvor safranina za protubojenje

Osnovna otopina:

Safranin O 2,5 g
95%-tni etanol 100 ml
Promiješajte i pohranite.
Razrijedite: 1:10 da bi dobili radnu otopinu.

Postupak bojenja

1. Pripremite razmaze, posušite na zraku i fiksirajte zagrijavanjem.
2. Prelijte stakalce rastvorom kristal violeta jednu minutu.
3. Kratko isperite tekućom vodom.
4. Prelijte rastvorom Lugola jednu minutu.
5. Isperite tekućom vodom i posušite filter-papirom.
6. Uklonite boju 95%-tnim etanolom, koji se dodaje kap po kap, dok se sva boja ne ukloni ili uronite razmaz na 30 sekundi i lagano tresite.
7. Isperite tekućom vodom i posušite filter-papirom.
8. Prelijte rastvorom safranina 10 sekundi.
9. Isperite tekućom vodom i posušite filter-papirom.

Gram pozitivne bakterije se oboje ljubičasto-plavo; Gram negativne bakterije se oboje ružičasto-crveno.

LITERATURA

1. Anonymous, 1987. Scheme of the detection and diagnosis of the ring rot bacterium *Corynebacterium sepedonicum* in batches of potato tubers. Commission of the European Communities, Luxembourg. Publ EUR 11288 EN, 21 str.
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, str. 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 str.
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 Kotth.) 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 str.
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 ŠHrsg.]. — 3. ed.; St. Paul, Minnesota.; 373 str.
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.

