

744.

Na osnovu člana 12 stav 5 Zakona o zdravstvenoj zaštiti bilja ("Službeni list RCG" broj 28/06), Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, donijelo je

P R A V I L N I K
O FITOSANITARNIM MJERAMA
ZA OTKRIVANJE, SPRJEČAVANJE ŠIRENJA I SUZBIJANJE PRSTENASTE TRULEŽI
KRTOLA KROMPIRA (POTATO RING ROT) KOJU PROUZROKUJE BAKTERIJA *Clavibacter*
michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al.

I. OSNOVNE ODREDBE

Predmet
Član 1

Ovim pravilnikom propisuju se fitosanitarne mjere za sprovođenje sistematskog istraživanja, utvrđivanje prisustva, rasprostranjenosti, sprječavanje širenja, suzbijanje i iskorjenjivanje prstenaste truleži krtola krompira (potato ring rot), koju prouzrokuje bakterija ***Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff)** Davis et al. (u daljem tekstu: štetni organizam) kao i postupci laboratorijskog testiranja za dijagnozu, detekciju i identifikaciju štetnog organizma.

Značenje izraza
Član 2

Izrazi upotrijebljeni u ovom pravilniku imaju sljedeća značenja:

- **vjerovatno prisustvo ili vjerovatna zaraza** označava utvrđeno prisustvo štetnog organizma potvrđeno prvobitnim testiranjem, a konačni rezultati su negativni, u kom slučaju se smatra da je organizam još uvijek prisutan ili da je zaraza vjerovatna zbog biološke odnosno klonske srodnosti ili u slučaju kada mehaničkim sredstvima koja se koriste na parceli može doći do kontakta sa biljkama domaćinima ili vodom, zbog mogućnosti kontaminacije;
- **zaražena parcela** je parcela na kojoj je laboratorijskom analizom zemljišta ili bilja utvrđeno prisustvo bakterije ***Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff)** Davis et al.;
- **sigurnosna zona (safety zone)** je područje koje okružuje zaraženu parcelu, a određuje se u skladu sa standardima o fitosanitarnim postupcima Evropske i mediteranske organizacije za zaštitu bilja (EPPO) u zavisnosti od procjene rizika od širenja štetnog organizma;
- **partija** je količina bilja koje se može identifikovati u odnosu na homogenost sastava i izvor;
- **posjed** su zemljište, objekti i prevozna sredstva proizvođača bilja.

II. SISTEMATSKO ISTRAŽIVANJE

Postupak sprovođenja sistematskog istraživanja
Član 3

Radi utvrđivanja prisustva uzročnika prstenaste truleži krtola krompira, Fitosanitarna uprava donosi operativni program posebnog nadzora kroz godišnja sistematska istraživanja u skladu sa godišnjim programom.

Programom iz stava 1 ovog člana utvrđuje se broj, porijeklo, dinamika i vrijeme uzimanja uzoraka, na osnovu jasnih naučnih i statističkih principa i biologije štetnog organizma.

U okviru sistematskog istraživanja obavlja se zdravstveni pregled krtola, i ako je potrebno, biljaka krompira (*Solanum tuberosum* L.).

Prilikom zdravstvenog pregledu iz stava 3 ovog člana uzimaju se uzorci sjemenskog krompira i krompira koji nije namijenjen sadnji (u daljem tekstu: merkantilni krompir) iz partija u skladištima i dostavljaju se ovlašćenoj laboratoriji radi testiranja.

Pored uzimanja uzoraka iz stava 4 ovog člana u slučaju potrebe, mogu se uzeti i dodatni uzorci krtola radi vizuelnog pregleda prerezanih krtola.

Prilikom zdravstvenog pregledu biljaka krompira uzimaju se uzorci biljaka i dostavljaju laboratoriji radi testiranja.

Laboratorijsko testiranje iz st. 4 i 6 ovog člana, sprovodi se u skladu sa standardnim postupkom za dijagnozu bakterije *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., Evropske i mediteranske organizacije za zaštitu bilja (EPPO) i Evropske unije (u daljem tekstu: propisani postupak), datim u Prilogu 1 koji je odštampan uz ovaj pravilnik i čini njegov sastavni dio.

O rezultatima sistematskog istraživanja iz stava 1 ovog člana, obavještaavaju se države članice Evropske unije i Evropska Komisija najmanje jednom godišnje.

III. SUMNJA NA ZARAZU

Utvrđivanje sumnje na zarazu

Član 4

Sumnja na zarazu štetnim organizmom postoji ako:

- su uočeni simptomi bolesti ili
- je rezultat imunofluorescentnog ili drugog brzog testa provjere pozitivan.

Da bi se potvrdila ili otklonila sumnja na zarazu štetnim organizmom, sprovode se dalja laboratorijska testiranja u skladu sa propisanim postupkom.

Do dobijanja konačnih rezultata laboratorijskog testiranja iz stava 2 ovog člana, fitosanitarni inspektor:

- 1) zabranjuje premještanje svih partija ili pošiljki krompira iz kojih su uzeti uzorci, osim ako se to premještanje obavlja pod njegovim nadzorom pod uslovom da ne postoji rizik od širenja štetnog organizma;
- 2) preduzima potrebne mjere radi otkrivanja mogućeg izvora zaraze štetnim organizmom,
- 3) nalaže odgovarajuće dodatne mjere radi sprječavanja širenja štetnog organizma u zavisnosti od procijenjenog stepena rizika (službeni nadzor nad premještanjem svih krtola ili biljaka, unutar i izvan posjeda, u slučaju postojanja sumnje na zarazu štetnim organizmom).

Čuvanje dokaznog materijala

Član 5

U slučaju sumnje na zarazu štetnim organizmom, do dobijanja konačnog rezultata laboratorijskog testiranja, laboratorija je dužna da zadrži i na propisan način čuva:

- sve uzorkovane krtole i ako je moguće, sve uzorkovane biljke;
- sav preostali ekstrakt i dodatno pripremljen materijal za brze testove provjere (npr. stakalca za imunofluorescenciju i sl.);
- odgovarajuću dokumentaciju.

Na osnovu uzorka iz stava 1 alineja 1 ovog člana, u slučaju potrebe, vrši se testiranje sortnosti krtola krompira.

U slučaju kada je laboratorijskim testiranjem potvrđena zaraza štetnim organizmom, laboratorija je dužna da najmanje mjesec dana nakon obavještanja država članica Evropske unije i Evropske Komisije o potvrđenij zarazi štetnim organizmom, zadrži i na propisan način čuva:

- materijal iz stava 1 ovog člana;

- uzorak vještački zaraženih test biljaka patlidžana i
- izolovanu kulturu štetnog organizma.

IV. POTVRĐENA ZARAZA

Postupak u slučaju potvrđene zaraze

Član 6

Ako se laboratorijskim testiranjem uzorka krtola krompira, biljaka ili dijelova biljaka krompira potvrdi zaraza štetnim organizmom, fitosanitarni inspektor:

- 1) označava kao zaražene krtole i biljke, pošiljku ili partiju, uređaje, prevozna sredstva, skladišta ili njihove djelove, sve druge objekte i predmete, uključujući materijal za pakovanje iz kojih je uzorak uzet, a prema potrebi i mjesta proizvodnje i parcele sa kojih su krtole i biljke krompira izvađene;
- 2) određuje obim vjerovatne zaraze;
- 3) određuje mjere za sigurnosnu zonu na osnovu potvrđene zaraze, obima vjerovatne zaraze i mogućeg širenja štetnog organizma date u Prilogu 2 koji je odštampan uz ovaj pravilnik i čini njegov sastavni dio.

Moguće širenje štetnog organizma iz stava 1 tačka 3 ovog člana određuje se na osnovu:

- blizine drugih mjesta proizvodnje krompira i drugih biljaka domaćina;
- zajedničke proizvodnje i zajedničke upotrebe zaliha sjemenskog krompira.

O preduzetim mjerama iz stava 1 ovog člana fitosanitarni inspektor obavještava Fitosanitarnu upravu radi razgraničenja područja, odnosno proglašavanja zaražene parcele i određivanja granica zaražene parcele i sigurnosne zone.

Sigurnosna zona mora biti dovoljno velika da osigura zaštitu okolnih površina.

U slučaju zaraze više parcela, određuje se izvor primarne zaraze i obim vjerovatne zaraze, u skladu sa rezultatima sistematskog istraživanja i procjene rizika za širenje štetnog organizma.

Obavještenje o pojavi bakterije *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., Fitosanitarna uprava objavljuje na svojoj web stranici i u najmanje jednom štampanom mediju, koji se distribuira na teritoriji Crne Gore.

Obim vjerovatne zaraze

Član 7

Fitosanitarni inspektor određuje obim vjerovatne zaraze iz člana 6 stav 1 tačka 2 ovog pravilnika, na osnovu informacija i/ili saznanja o mogućim kontaktima sa utvrđenom zarazom prije i poslije vađenja krompira ili kontakata tokom proizvodnje, uzimajući u obzir:

- 1) krtole ili biljke uzgajane na mjestu proizvodnje koje je označeno kao zaraženo mjesto;
- 2) mjesto ili mjesta proizvodnje, koja su u bilo kakvoj vezi sa proizvodnjom krtola ili biljaka koja su označena kao zaražena, uključujući i mjesta na kojima su se koristili isti objekti i oprema za proizvodnju;
- 3) krtole ili biljke koje su proizvedene na mjestima proizvodnje iz tačke 2 ovog stava ili su se nalazile na tim mjestima proizvodnje, u vrijeme dok su krtole i biljke koje su označene kao zaražene, bile prisutne na mjestima proizvodnje koje je označeno kao zaraženo;
- 4) posjede na kojima se nalazi ili dorađuje krompir koji potiče sa mjesta proizvodnje iz tač. 1 do 3 ovog stava;
- 5) sve uređaje, prevozna sredstva, skladišta, ili njihove djelove i druge objekte ili predmete, uključujući i materijal za pakovanje, koji su mogli doći u dodir sa krtolama ili biljkama koje su označene kao zaražene;
- 6) sve krtole ili biljke koje su bile uskladištene ili u dodiru sa nekim od objekata ili predmeta iz tačke 5 ovog stava, prije čišćenja i dezinfekcije tih objekata i predmeta;
- 7) krtole ili biljke koje se smatraju vjerovatno zaraženim zbog klonske povezanosti sa krtolama ili biljkama koje su označene kao zaražene, iako su rezultati testiranja sprovedenog u skladu sa propisanim postupkom negativni, a kada je potrebno, može se

sprovести i test sortnosti da bi se provjerio identitet zaraženih i klonski srodnih krtola ili biljaka krompira i

8) mjesta proizvodnje krtola ili biljaka krompira iz tačke 7 ovog stava.

Moguće širenje štetnog organizma određuje se na osnovu:

- blizine drugih mjesta proizvodnje krompira i drugih biljaka domaćina;
- zajedničke proizvodnje i zajedničke upotrebe zaliha sjemenskog krompira.

Obavješćavanje u slučaju potvrđene zaraze

Član 8

Ako je laboratorijskim testiranjem sprovedenim u skladu sa propisanim postupkom potvrđena zaraza štetnim organizmom, o zarazi se nakon sprovedenog postupka, bez odlaganja, obavješćavaju države članice Evropske unije i Evropska Komisija.

Obavješćenje iz stava 1 ovog člana mora da sadrži najmanje sljedeće podatke o:

- nazivu sorte i partiji krompira ;
- namjeni krompira (merkantilni ili sjemenski), odnosno kategoriji sjemenskog krompira.

Obavješćenje o zarazi štetnim organizmom, Fitosanitarna uprava dostavlja organu nadležnom za zdravstvenu zaštitu bilja druge države kojoj prijeti rizik od širenja zaraze na krompir sa podacima o:

- nazivu sorte i partiji krompira;
- nazivu i adresi pošiljaoca i primaoca;
- datumu prispjeća partije krompira;
- veličini isporučene partije krompira;
- podacima iz biljnog pasoša odnosno otpremnice (kopija biljnog pasoša odnosno kopija otpremnice), ili o broju pasoša, registarskom broju uvoznika, proizvođača, prerađivača, distributera i skladištara.

O dostavljanju obavješćenja iz stava 3 ovog člana, izvještava se Evropska Komisija.

Uz obavješćenje iz stava 4 ovog člana, nakon završetka svih istraživanja o utvrđivanju zaraze štetnim organizmom, Evropskoj Komisiji dostavljaju se i sljedeći podaci:

- datum kada je zaraza potvrđena;
- kratak opis istraživanja sprovedenog radi identifikacije izvora i mogućeg širenja zaraze, uključujući i podatke o uzimanju uzoraka;
- o identifikovanim ili mogućim izvorima zaraze;
- o obimu označene zaraze, uključujući broj mjesta proizvodnje i broj partija sa nazivom sorte i kada se radi o sjemenskom krompiru- kategorija;
- o sigurnosnoj zoni, uključujući broj mjesta proizvodnje koja nijesu označena kao zaražena, ali su uključena u sigurnosnu zonu i
- drugi podaci o potvrđenoj iznenadnoj pojavi štetnog organizma koje zatraži Evropska Komisija.

U slučaju jednom potvrđene zaraze štetnim organizmom, Fitosanitarna uprava sačinjava izvještaj jednom godišnje koji objavljuje na svojoj web stranici.

Izvještaj iz stava 6 ovog člana sadrži sljedeće podatke o:

- zarazi i razgraničenju zaražene parcele i sigurnosne zone;
- preduzetim mjerama;
- nazivu sorte i partiji krompira;
- namjeni krompira (merkantilni ili sjemenski) odnosno, kategoriji sjemenskog krompira;
- datumu kada je zaraza potvrđena;
- postupku istraživanja (kratak opis), sprovedenog radi identifikacije izvora i mogućeg širenja zaraze, uključujući i podatke o uzimanju uzoraka;
- identifikovanim ili mogućim izvorima zaraze;
- opsegu označene zaraze, uključujući broj mjesta proizvodnje i broj partija sa nazivom sorte i kada se radi o sjemenskom krompiru- kategorija;

- sigurnosnoj zoni, uključujući broj mjesta proizvodnje koja nijesu označena kao zaražena, ali su uključena u sigurnosnu zonu i
- druge podatke o štetnom organizmu od značaja za posebni nadzor i njegovo planiranje.

O podacima iz st. 2 i 3 ovog člana Fitosanitarna uprava vodi evidenciju.

Testiranje klonski srodnog krompira

Član 9

Partije krompira koje su klonski srodne sa krtolama ili biljkama krompira koje su označene kao zaražene, podliježu obaveznom laboratorijskom testiranju u skladu sa propisanim postupkom.

Fitosanitarni inspektor na osnovu podataka Fitosanitarne uprave određuje testiranje onolikog broja uzoraka krtola ili biljaka koliko je potrebno da bi se odredio vjerovatni primarni izvor zaraze i obim vjerovatne zaraze, pri čemu redosljed testiranja zavisi od stepena rizika.

Nakon dobijanja rezultata laboratorijskog testiranja iz stava 1 ovog člana, fitosanitarni inspektor sprovodi dalje utvrđivanje zaraze, određuje obim vjerovatne zaraze i sigurnosnu zonu.

V. MJERE

Mjere i postupci sa zaraženim biljem

Član 10

Krtole ili biljke koje su označene kao zaražene ne smiju se saditi, već se pod nadzorom fitosanitarnog inspektora moraju podvrgnuti jednoj od sljedećih mjera i postupaka, pod uslovom da ne postoji rizik od širenja štetnog organizma i to:

- uništavanje ili
- upotreba kao hrana za životinje nakon odgovarajuće toplotne obrade, koja ne ostavlja nikakvu mogućnost preživljavanja štetnog organizma ili
- odlaganje na mjestu određenom za odlaganje otpada, za koje je utvrđeno da ne postoji rizik od nekontrolisanog širenja štetnog organizma u okolinu (cijedenjem kroz pore tla do poljoprivrednog zemljišta) ili
- spaljivanje ili
- industrijska prerada, pod uslovom da se zaražene krtole ili biljke krompira odmah nakon utvrđivanja zaraze dopreme do mjesta prerade, na kojem mora postojati oprema za odlaganje otpada čijim se korišćenjem otklanja rizik od širenja štetnog organizma i na kojem postoji sistem za čišćenje i dezinfekciju prevoznih sredstava koji napuštaju mjesto prerade ili
- i druge mjere, radi suzbijanja širenja štetnog organizma.

O mjerama iz stava 1 ovog člana i njihovoj opravdanosti obavještava se Evropska Komisija i države članice Evropske Unije.

Preostali otpad koji je nastao kao rezultat sprovođenja mjera iz stava 1 ovog člana, odlaze se u skladu sa postupkom o odlaganju otpada iz člana 13 ovog pravilnika.

Mjere i postupci sa vjerovatno zaraženim krompirom

Član 11

Krtole ili biljke krompira koje se smatraju vjerovatno zaraženim štetnim organizmom u skladu sa članom 7 ovog pravilnika, ne smiju se saditi, već se pod nadzorom fitosanitarnog inspektora mogu se koristiti:

- kao merkantilni krompir namijenjen ishrani, pri čemu mora biti pakovan na mjestima koja raspolažu odgovarajućom opremom za odlaganje otpada i koji je spreman za neposrednu dostavu i upotrebu bez naknadnog prepakovanja a sa sjemenskim

krompirom dozvoljeno je rukovati na istim mjestima samo ako se radi odvojeno ili nakon čišćenja i dezinfekcije ili

- kao merkantilni krompir namijenjen industrijskoj preradi, uz direktnu i brzu dostavu do pogona za preradu, koji mora raspolagati odgovarajućom opremom za odlaganje otpada i sistemom za čišćenje i dezinfekciju onih prevoznih sredstava koji napuštaju mjesto prerade ili
- odložiti na propisan način, pod uslovom da nema rizika od širenja štetnog organizma.

Mjere iz stava 1 ovog člana primjenjuju se i na krtole ili biljke krompira koje su klonski povezane sa krtolama ili biljkama krompira koje su označeni kao zaražene, bez obzira na rezultate testiranja iz člana 9 ovog pravilnika.

Čišćenje i dezinfekcija

Član 12

Uređaji, prevozna sredstva, skladišta i njihovi dijelovi, ili drugi objekti i predmeti, uključujući materijal za pakovanje, koji su označeni kao zaraženi ili se smatraju vjerovatno zaraženim, moraju se uništiti ili očistiti ili na odgovarajući način dezinfikovati, radi otklanjanja rizika od širenja štetnog organizma.

Objekti i predmeti, nakon izvršene dezinfekcije iz stava 1 ovog člana, ne smatraju se zaraženim.

Postupci odlaganja otpada

Član 13

Odlaganje otpada nastalog u postupku industrijske prerade iz člana 11 ovog pravilnika mora se izvršiti na način da se izbjegne svaki rizik od širenja štetnog organizma i to:

- 1) otpad krompira (uključujući odbačeni krompir i koru) i drugi čvrsti otpad koji je u vezi sa krompirom (uključujući zemljište, kamenje i druge ostatke):
 - odlaže se na mjestu određenom za odlaganje otpada, na kojem ne postoji rizik od nekontrolisanog širenja štetnog organizma u okolinu (cijedenjem kroz pore tla do poljoprivrednog zemljišta), tako da se otpad prevozi direktno, u zatvorenom prevoznom sredstvu ili
 - spaljuje ili
 - se odstranjuje primjenom drugih mjera koje ne dovode do rizika od širenja štetnog organizma o čemu se vodi evidencija radi daljeg izvještavanja Evropske Komisije i država članica Evropske unije.
- 2) tečni otpad nastao u preradi koji sadrži čvrste čestice u rasutom stanju, prije uklanjanja mora se filtrirati ili obraditi postupkom sedimentacije radi odstranjivanja čvrstih čestica, nakon čega se čestice uklanjaju na način iz tačke 1 ovog stava, a tečni dio otpada mora se:
 - prije odstranjivanja u cjelosti zagrijati na temperaturi od najmanje 60° C u trajanju od najmanje 30 minuta ili
 - odstraniti pod službenim nadzorom na drugi propisan način koji onemogućava da otpad dođe u dodir sa poljoprivrednim zemljištem, o čemu se vodi evidencija radi daljeg izvještavanja Evropske Komisije i država članica Evropske unije.

Postupci iz stava 1 ovog člana primjenjuju se i na otpad koji nastaje tokom rukovanja, odstranjivanja i prerade zaraženih partija krtola krompira.

Mjere u sigurnosnoj zoni

Član 14

U sigurnosnoj zoni primjenjuju se mjere iz Priloga 2 ovog pravilnika.

Postupak sa sjemenskim krompirom

Član 15

Sjemenski krompir mora da vodi porijeklo od materijala dobijenog u skladu sa propisanim postupkom kontrole za koji je sprovedenim laboratorijskim testiranjem utvrđeno da nije zaražen štetnim organizmom.

Testiranje sjemenskog krompira iz stava 1 ovog člana sprovodi se:

- 1) u slučajevima kada zaraza ugrožava proizvodnju sjemenskog krompira, na biljkama iz početne faze klonske selekcije ;
- 2) u drugim slučajevima:
 - ili na biljkama iz početne faze klonske selekcije;
 - ili na reprezentativnim uzorcima osnovnog sjemena krompira, odnosno ranijih generacija u lancu vegetativnog razmnožavanja.

Posjedovanje i korišćenje štetnog organizma

Član 16

Štetni organizam se ne smije posjedovati i na bilo koji način koristiti.

Izuzeci

Član 17

Izuzetno od člana 16 ovog pravilnika, štetni organizmi se mogu posjedovati i koristiti samo za eksperimentalne, naučne i selekcijske svrhe, pod uslovom da se time ne narušava nadzor nad štetnim organizmom i da nema rizika od njegovog širenja.

Druge mjere

Član 18

Radi suzbijanja ili sprječavanja širenja štetnog organizma, pored mjera propisanih ovim pravilnikom, mogu se primjeniti i druge dodatne mjere, o čemu se obavještavaju Evropska Komisija i države članice Evropske Unije.

Mjerama iz stava 1 ovog člana može se odrediti:

- sadnja samo sertifikovanog sjemenskog krompira ili
- da se sjemenski krompir koji je proizvođač proizveo na svojoj parceli može koristiti kao sjemenski, samo na svojoj parceli pod uslovom da ispunjava propisane zdravstvene uslove i
- druge mjere u skladu sa zakonom.

VI ZAVRŠNA ODREDBA

Član 19

Ovaj pravilnik stupa na snagu osmog dana od dana objavljivanja u „Službenom listu Crne Gore“.

Broj: 11/10-0401-3233/7
Podgorica, 09. novembra 2010. godine

Ministar,
mr **Milutin Simović**, s.r.

* Pravilnik je usaglašen sa Direktivom Savjeta **93/85/EC** od 4. oktobra 1993 o kontroli *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. **ssp. sepedonicus** (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., prouzrokovaca prstenaste truleži krtola krompira (*Council Directive 93/85EC of 4 October 1993 on control of Potato Ring Rot*)

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

Prikazana šema testiranja opisuje različite postupke za:

- dijagnozu prstenaste truleži na krtolama i biljkama krompira;
- detekciju bakterije *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* u uzorcima krtola i biljaka krompira;
- identifikaciju bakterije *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*C. m. subsp. sepedonicus*).

Ovaj Prilog sadrži optimalne protokole za pojedine metode, validne (potvrđene i odobrene) reagense i pojedinosti za pripremu materijala za testiranje i kontrolnog (referentnog) materijala.

Popis laboratorija koje su učestvovala u optimizaciji i validaciji protokola nalazi se u Dodatku 1.

S obzirom da protokoli uključuju metode detekcije karantinskog organizma i da podrazumijevaju upotrebu živih kultura *C. m. subsp. sepedonicus* kao kontrolnih (referentnih) materijala, postupci se morati izvoditi u propisanim karantinskim uslovima sa odgovarajućim objektima za odlaganje, čuvanje i uništavanje otpada u skladu sa ovim pravilnikom.

Parametri testiranja moraju osigurati ujednačene i ponovljive nivoe detekcije *C. m. subsp. sepedonicus* prema propisanim pragovima osjetljivosti pojedinih metoda.

Precizna priprema pozitivnih kontrola je obavezna.

Testiranje u skladu sa zahtjevanim pragom osjetljivosti podrazumijeva pravilno postavljanje, održavanje i kalibriranje opreme, pažljivo čuvanje i rukovanje reagensima kao i preduzimanje mjera za sprječavanje kontaminacije među uzorcima, npr. razdvajanje pozitivnih kontrola od uzoraka za testiranje. Moraju se primijeniti standardi kontrole kvaliteta kako bi se izbjegle administrativne i druge greške, posebno pri označavanju uzoraka i vođenju dokumentacije.

Sumnja na prisustvo patogena u uzorku podrazumijeva pozitivan rezultat testa provjere uzorka, kao što je prikazano u dijagramima toka.

Ako je rezultat prvog testa provjere (IF ili PCR/FISH,) pozitivan, tada se sumnja na prisustvo bakterije *C. m. subsp. sepedonicus* i mora se sprovesti 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. subsp. sepedonicus*.

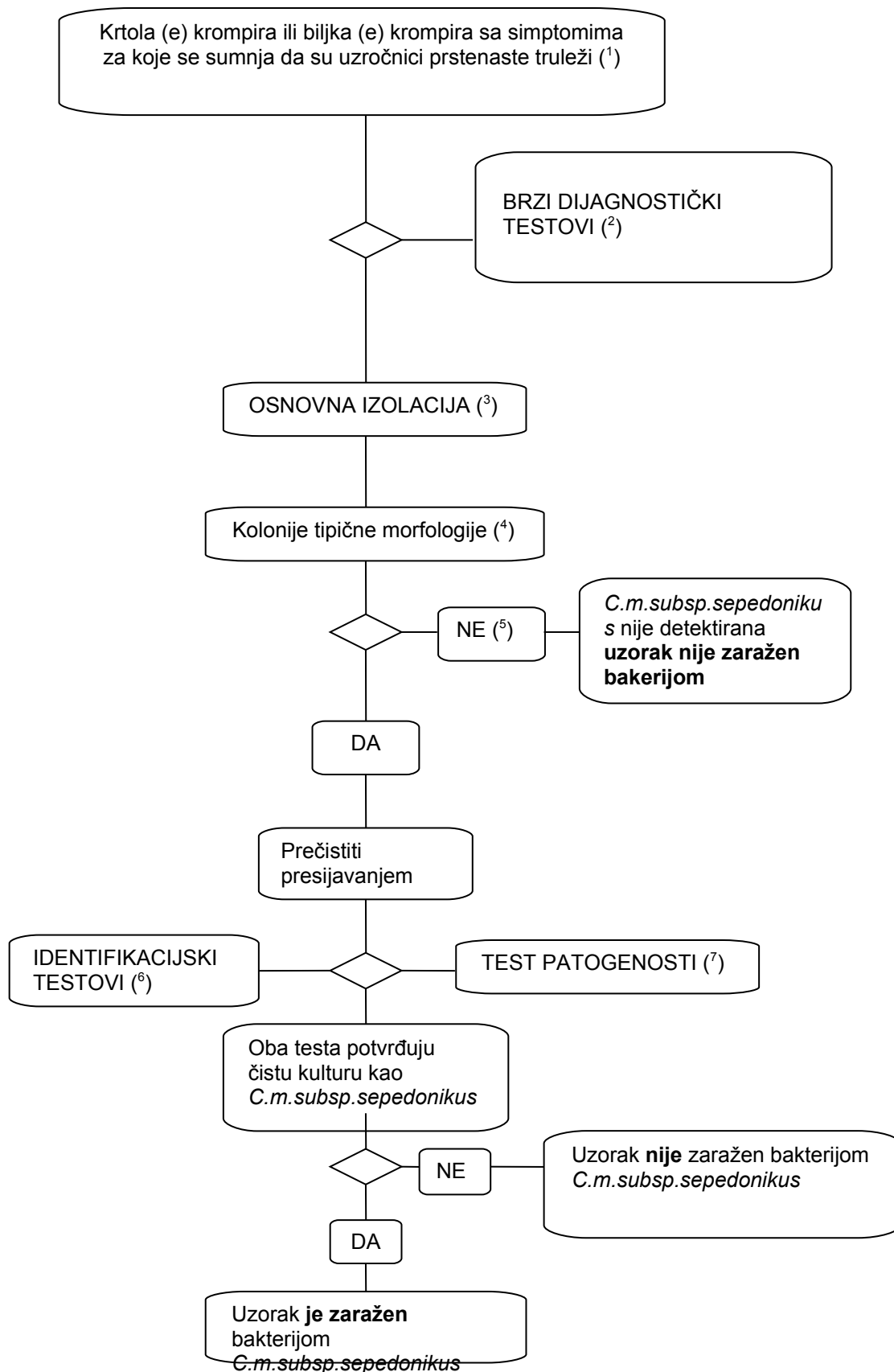
Pozitivan rezultat IF testa se definiše kao pozitivno očitavanje IF testa koje je potvrđeno i drugim testom provjere (PCR/FISH).

Potvrđeno prisustvo patogena podrazumijeva izolaciju i identifikaciju čiste kulture *C. m. subsp. sepedonicus* i potvrdu patogenosti.

DIO 1. PRIKAZ DIJAGRAMA TOKA

1.1. Šema utvrđivanja prisustva prouzrokovala prstenaste truleži u krtolama i biljkama krompira sa tipičnim simptomima prstenaste truleži

Postupak testiranja je namijenjen za krtole i biljke krompira sa simptomima tipičnim za ili koji izazivaju sumnju na prstenastu trulež. Postupak uključuje brzi test provjere, izolaciju patogena iz zaraženog sprovodnog tkiva na dijagnostičkoj hranjivoj podlozi i u slučaju pozitivnog rezultata, identifikaciju čiste kulture bakterije *C. m. subsp. sepedonicus*.



(¹) Opis simptoma naveden je u Dileu 2
Krtola(i) krompira ili
biljaka(e) krompira, paradajza ili
drugih domadina sa simptomima
za koje se sumnja da su uzročnici
smeđa trulež ili bakterijsko
uvenude (¹)

(²) Odgovarajući testovi su:

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

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

(⁴) Opis tipične morfologije kolonije naveden je u Dijelu 8.

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

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

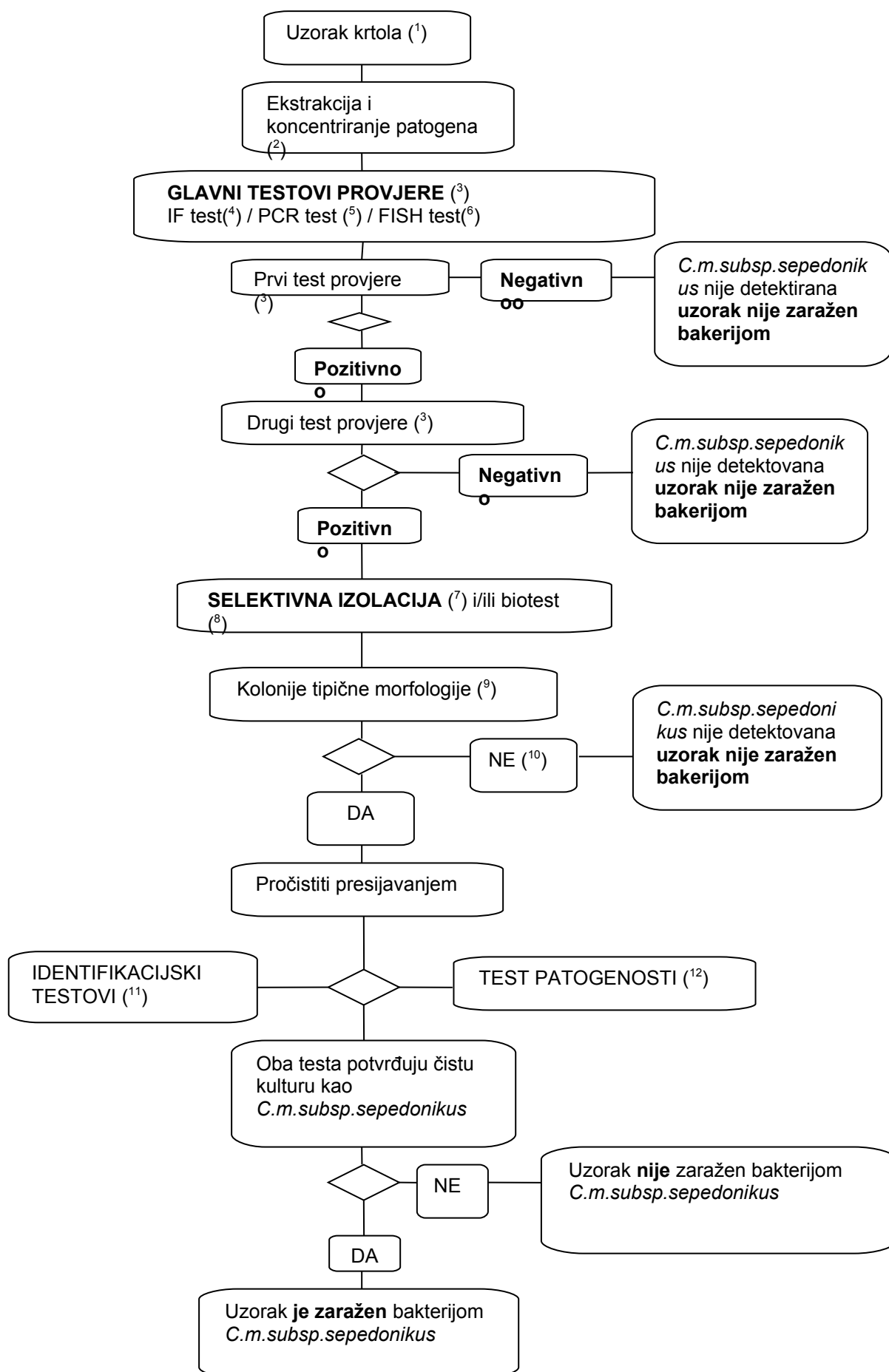
(⁷) Test patogenosti opisan je u Dijelu 10.

1.2. Šema za utvrđivanje prisustva i identifikaciju bakterije *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* u uzorcima krtola krompira bez vidljivih simptoma

Postupak testiranja namijenjen je za otkrivanje skrivene zaraze u krtolama krompira. Pozitivan rezultat iz najmanje dva testa provjere, koji se zasnivaju na različitim biološkim načelima, dopunjuje se izolacijom patogena, nakon kojeg slijedi, u slučaju izolacije tipičnih kolonija, potvrda čiste kulture *C. m. subsp. sepedonicus*.

Pozitivan rezultat samo jednog od testova provjere nije dovoljan da bi se uzorak smatrao vjerojatno zaraženim.

Testovi provjere i izolacija moraju omogućiti nivo osjetljivosti detekcije 10^3 do 10^4 ćelija/ml resuspendovanog taloga, uključenog kao pozitivna kontrola u svakoj seriji testova.



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

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

(³) Ako su rezultati najmanje dva testa, koji se zasnivaju na različitim biološkim načelima, pozitivni, potrebno je izvršiti izolaciju i potvrdu prisustva patogena. Izvršiti bar 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 sprovesti drugi ili više testova provjere, koji se zasnivaju 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. Dalji testovi nijesu potrebni.

(⁴) Test imunofluorescencije (IF).

Koristiti poliklonalna antitijela za IF provjeru, dodatna monoklonalna antitijela omogućavaju veću specifičnost (Dio 4).

(⁵) PCR test.

Koristiti potvrđene i odobrene reagense i protokole za PCR (Dio 6).

(⁶) FISH test.

Koristiti potvrđene reagense i protokole (Dio 5).

(⁷) Selektivna izolacija.

Korišćenje MTNA ili NCP-88 hranjivih podloga i 1/100 razrijeđenja resuspendovanog taloga je u mnogim slučajevima odgovarajuća metoda za direktnu izolaciju *C. m. subsp. sepedonicus*. Tipične kolonije mogu se dobiti 3 do 10 dana nakon zasijavanja na hranjivu podlogu. Patogen se tada može prečistiti i identifikovati. Kako bi se u cijelosti iskoristile mogućnosti testa, potrebna je pažljivo vađenje i priprema konusa pupčanog dijela krtola kako bi se izbjegle saprofitne bakterije sa krtola krompira, koje su na hranjivoj podlozi konkurencija bakteriji *C. m. subsp. sepedonicus* i mogu je prerasti. Ako se patogen ne može izolovati na hranjivoj podlozi, potrebno je ponoviti postupak izolacije korišćenjem biljaka iz biološkog testa (Dio 8).

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

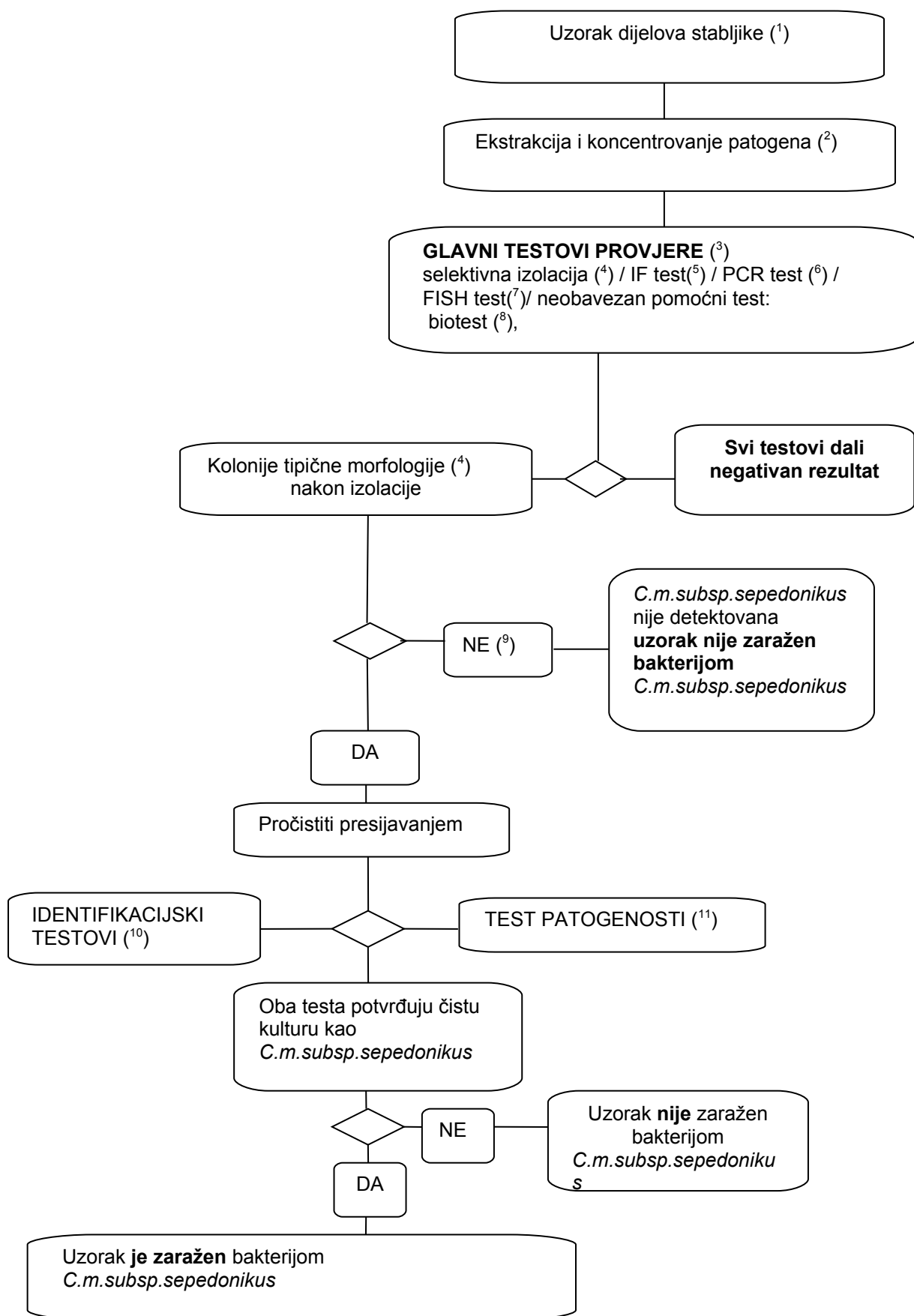
(⁹) Tipična morfologija kolonije opisana je u Dijelu 8.

(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, ponoviti testove izolacije iz istog resuspendovanog taloga ili ponoviti uzimanje sprovednog tkiva na mjestu vezivanja stolona kod krtola iz istog uzorka i ako je potrebno, testirati dodatne uzorke.

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

(¹²) Test patogenosti opisan je u Dijelu 10.

1.3. Šema za utvrđivanje prisustva i identifikaciju bakterije *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* u uzorcima biljaka krompira bez simptoma



- (¹) Preporučene veličine uzoraka navedene su u Dijelu 3.2.
- (²) Metode ekstrakcije i koncentrovanja patogena opisane su u Dijelu 3.2.
- (³) Ako su rezultati najmanje dva testa, koji se temelje na različitim biološkim načelima, pozitivni, potrebno je sprovesti izolaciju i potvrdu prisustva patogena. Izvršiti bar jedan test provjere. Kada je rezultat testa negativan, smatra se da je uzorak negativan. U slučaju da je rezultat tog testa pozitivan, potrebno je izvršiti 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. Dalji testovi nijesu 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, ponoviti testove izolacije iz istog resuspendovanog taloga ili ponoviti uzimanje sprovednog tkiva na mjestu vezivanja stolona kod krtola iz istog uzorka i ako je potrebno, testirati dodatne uzorke.
- (¹⁰) Pouzdana identifikacija čistih kultura *C. m. subsp. sepedonicus* postiže se izvođenjem testova opisanih u Dijelu 9.
- (¹¹) Test patogenosti opisan je u Dijelu 10.

DIO 2. VIZUELNI PREGLED ZA OTKRIVANJE SIMPTOMA PRSTENASTE TRULEŽI

2.1. Biljke krompira

U evropskim klimatskim uslovima simptomi se rijetko pronalaze u polju i to često tek na kraju sezone. Osim toga, simptomi su često prikriveni ili se mogu zamijeniti sa drugim bolestima, starenjem ili mehaničkim oštećenjima. Stoga možemo vrlo lako previdjeti simptome prilikom pregleda u polju. Simptomi uvenuća vrlo su različiti od onih smeđe truleži; uvenuće je obično polagano i u početku ograničeno na ivice listova. Mladi zaraženi listovi često nastavljaju rast, iako manje u zaraženim dijelovima, pa su listovi neobičnog oblika. Listovi zbog blokade sprovednog tkiva u donjem dijelu stabljike često imaju hlorotične, žuto-narandžaste dijelove između lisnih žila. Zaraženi listići, listovi, čak i stabljike mogu vremenom propasti. Često su listovi i krtole samo manje veličine. Povremeno su biljke zakržljale.

2.2. Krtole krompira

Najraniji simptomi su lagana staklenost ili prozirnost tkiva bez omekšanja oko sprovednog sistema, naročito u blizini pupčanog dijela krtole. Sprovedni prsten na pupčanom dijelu krtole može biti malo tamnije boje od uobičajene. Prvi lako uočljiv simptom je žućkasta boja sprovednog prstena, a kada se krtola blagio stisne, iz sprovednih sudova izlaze male količine materije siraste konzistencije, koja sadrži milione bakterija. Sprovedno tkivo može posmeđiti i simptomi na krtoli u ovom stadijumu slični su simptomima smeđe truleži koju uzrokuje *Ralstonia solanacearum*. U početku, ti simptomi mogu biti ograničeni na jedan dio sprovednog prstena, ne obavezno blizu pupčanog dijela krtole i mogu se postupno proširiti na cijeli prsten. Kako infekcija napreduje, dolazi do propadanja sprovednog tkiva; spoljašnja i unutrašnja kora se mogu razdvojiti. U naprednim stadijumima infekcije, na površini krtola pojavljuju se pukotine, koje su često crvenkasto-smeđe po ivicama. Nedavno je u Evropi zabilježeno nekoliko slučajeva u kojima je središte krtole trunulo istovremeno sa sprovednim prstenom što je dovelo do sekundarnog napada patogena i unutrašnjim stvaranjem šupljina i nekroza. Sekundarni gljivični ili bakterijski napad može prikriti simptome i može biti teško, čak nemoguće, razlikovati uznapredovale simptome prstenaste truleži od drugih truleži krtola. Moguća je pojava i netipičnih simptoma prstenaste truleži.

DIO 3. PRIPREMA UZORKA

3.1. Krtole krompira

Napomena:

- Standardna veličina uzorka je 200 krtola po testu. Intenzivnije uzorkovanje zahtijeva izvođenje većeg broja testova na uzorcima te veličine. Veći broj krtola u uzorku dovešće do inhibicije ili će otežati tumačenje rezultata. Međutim, postupak se može primijeniti i za uzorke sa manje od 200 krtola, kada je na raspolaganju manje krtola.
- Validacija svih metoda za itvrđivanje prisustva patogena, koje su opisane u daljem tekstu, zasniva se na testiranju uzoraka od 200 krtola.
- Ekstrakt krompira koji je opisan u daljem tekstu može se koristiti i za itvrđivanje prisustva prouzrokovala smeđe truleži krompira, bakterije *Ralstonia solanacearum*.

Procedura koja predhodi pripremi uzorka:

Oprati krtole. Upotrijebiti odgovarajuća dezinfekciona sredstva (hlorna jedinjenja za sprovođenje PCR testa kako bi se uklonila moguća DNK patogena) i deterdžente između svakog uzorka.

Osušiti krtole na vazduhu. Postupak pranja je posebno koristan (ali ne obavezan) za uzorke sa previše zemlje i ako se izvodi PCR test ili procedura direktne izolacije.

3.1.1. Čistim i dezinfikovanim skalpelom ili nožem za povrće ukloniti pokožicu sa pupčanog dijela krtole tako da sprovodno tkivo bude vidljivo. Pažljivo izrezati mali konusni dio sprovodnog tkiva na pupčanom dijelu krtole (u daljem tekstu: isječak) pazeći da se zahvati što manje okolnog, nesprovodnog tkiva.

Napomena:

Odvojiti sve krtole sa mogućim simptomima prstenaste truleži i testirajte posebno. Ako se prilikom vađenja isječka primjete mogući simptomi prstenaste truleži, krtole treba vizualno pregledati. Svaku prerezanu krtolu sa mogućim simptomima treba ostaviti dva dana na sobnoj temperaturi i čuvati u karantinskim uslovima (na 4 do 10 °C) sve dok se ne dovrše svi testovi. Sve krtole u uzorku (uključujući one sa sumnjivim simptomima) treba čuvati u skladu sa članom 5 ovog pravilnika.

3.1.2. Staviti isječak u sterilne posude za jednokratnu upotrebu koje se mogu zatvoriti i/ili hermetički zatvoriti (ako su posude već upotrebljavane, moraju se temeljno očistiti i dezinfikovati jedinjenjima hlora). Uzorke je poželjno odmah obraditi. Ako to nije moguće, čuvati ih u posudi bez dodatka pufera, najduže 72 sata u frižideru ili najduže 24 sata na sobnoj temperaturi. Sušenje i suberizacija isječka, kao i rast saprofita tokom čuvanja mogu ometati utvrđivanje prisustva bakterije uzročnika prstenaste truleži.

3.1.3. Obraditi isječke jednim od sljedećih postupaka:

a) isječke prekriti dovoljnom količinom (oko 40 ml) ekstrakcijskog pufera (Dodatak 3) da pokrije isječke i ultracentrifugirati (50 do 100 obrtaja/min) četiri sata na temperaturi ispod 24 °C ili 16 do 24 sata uz hlađenje;

ili

b) homogenizovati isječke sa dovoljnom količinom (oko 40 ml) ekstrakcijskog pufera (Dodatak 3), bilo u miješalici (npr. Waring ili Ultra Thurax) bilo drobljenjem u dobro zatvorenoj kesi za maceraciju za jednokratnu upotrebu (npr. kese Stomacher ili Bioreba od čvrstog politena, 150

mm x 250 mm, sterilizovane zračenjem) koristeći gumeni čekić ili odgovarajući aparat za maceriranje (drobilicu) (npr. Homex).

Napomena:

Ako se uzorci homogenizuju u blenderu, postoji veliki rizik od njihove unakrsne kontaminacije. Preduzeti mjere opreza radi sprječavanja nastajanja aerosola ili prosipanja tokom postupka ekstrakcije. Za svaki uzorak upotrijebiti sterilizovane nožice i posude. Ako se sprovodi PCR test, spriječiti prenos DNK na kontejnere ili aparaturu za maceriranje. Za PCR test preporučuje se maceriranje uzoraka u kesicama za jednokratnu upotrebu i dalje korišćenje epruveta i tuba za jednokratnu uporabu.

3.1.4. Odliti supernatant. Ako je previše mutan, razbistriti ga ultracentrifugiranjem na manjem broju obrtaja (najviše 180 g/ 10 minuta na temperaturi od 4 do 10 °C) ili vakumskom filtracijom (40 do 100 µm), tokom koje se filteri dodatno ispira ekstrakcionim puferom (oko 10 ml) (Dodatak 3).

3.1.5. Izvršiti Koncentrisanje frakcije bakterije centrifugiranjem na 7 000 g 15 minuta (ili 10 000 g 10 minuta) na temperaturi od 4 do 10 °C, posle čega se pažljivo, bez miješanja sa talogom odliva supernatant.

3.1.6. Resuspendovati talog u 1,5 ml pelet pufera za talog (Dodatak 3). Upotrijebiti 500 µl za testiranje na *C. m. subsp. sepedonicus*, 500 µl za *Ralstonia solanacearum* i 500 µl kao referentni materijal za čuvanje. U poslednji, referenti dio od 500 µl dodati sterilni glicerol u konačnoj koncentraciji od 10 do 25 % (v/v), promiješati i čuvati na temperaturi od –16 do –24 °C (danima) ili na –68 do –86 °C (mjesecima). Djelove odvojene za utvrđivanje prisustva bakterija tokom testiranja čuvati na 4 do 10 °C.

Ne preporučuje se višestruko zamrzavanje i odmrzavanje.

Ako je potreban transport ekstrakta, osigurati dostavu u prenosivom frižideru u roku od 24 do 48 sati.

3.1.7. Sve pozitivne kontrole i uzorci *C. m. subsp. sepedonicus* moraju se odvojeno pripremiti i obraditi kako bi se izbjegla kontaminacija. Ovo se odnosi i na stakalca za imunofluorescenciju kao i na sve ostale testove.

3.2. Biljke krompira

Napomena:

Za otkrivanje latentnih populacija bakterije *C.m.subsp.sepedonicus* preporučuje se testiranje zbirnih uzoraka. Postupak se može pogodno primijeniti na zbirne uzorke sa najviše 200 dijelova stabljika. (uzimanje uzoraka tokom sprovođenja nadzora se mora temeljiti na statistički reprezentativnom uzorku ispitivane biljne populacije).

3.2.1. Čistim dezinfikovanim nožem ili makazama za rezidbu odrezati jedan do dva cm donjeg dijela svake stabljike, odmah iznad površine zemljišta.

Kratko dezinfikovati dijelove stabljika 70 % etanolom i odmah osušiti upijajućim papirom.

Staviti dijelove stabljika u zatvorenu sterilnu posudu.

3.2.2. Obraditi dijelove stabljika pomoću jednog od sljedećih postupaka:

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

ili

b) djelove stabljike izmacerirati u čvrstoj kesi za maceraciju (npr. Stomacher ili Bioreba) sa odgovarajućom količinom ekstrakcijskog pufera (Dodatak 4) koristeći gumeni čekić ili odgovarajuću opremu za maceriranje (npr. Homex). Ako to nije moguće, dijelove stabljike čuvati u frižideru, najdulže 72 sata ili na sobnoj temperaturi najduže 24 sata.

3.2.3. Nakon 15 minuta taloženja, odliti supernatant.

3.2.4. Dalje izbistravanje ekstrakta ili koncentrovanje 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. Podijeliti čisti ili koncentrovani ekstrakt uzorka na dva jednaka dijela. Jednu polovinu čuvati na temperaturi od 4 do 10 °C tokom testiranja, a drugu polovinu ostaviti za slučaj upotrebe u dodatnim testiranjima: u ekstrakt se dodaje 10-25 % (v/v) sterilnog glicerola i čuva na temperaturi od – 16 do – 24 °C (nedeljama) ili na –68 do –86 °C (mjesecima).

DIO 4. IF TEST

Načelo

Upotreba IF testa kao glavnog testa provjere preporučuje se zbog njegove dokazane ujednačenosti u postizanju zahtijevanih pragova osjetljivosti metode.

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

Napomena:

Uvijek koristiti poliklonalna antitijela kada se IF test koristi kao glavni test provjere. U slučaju pozitivnog IF očitavanja sa poliklonalnim antitijelima, dalja provjera upotrebom monoklonalnih antitijela može omogućiti veću specifičnost, ali može i umanjiti osjetljivost testa.

Upotrijebiti antitijela za referentni soj *C. m. subsp. sepedonicus*. Preporučuje se da se titar odredi za svaku novu seriju antitijela. Titar se definiše kao najveće razrijeđenje kod kojeg dolazi do optimalne reakcije pri testiranju suspenzije koja sadrži 10^5 do 10^6 ćelija po ml odgovarajućeg soja *C. m. subsp. sepedonicus* uz korištenje fluorescein-izotiocijanata (FITC) konjugiranih antitijela u skladu sa preporukama proizvođača. Nerazrijeđena poliklonalna i monoklonalna antitijela treba da imaju IF titar najmanje 1:2000. Tokom testiranja koristiti radna razrijeđenja antitijela, koja su blizu ili jednaka titru. Koristiti potvrđena i odobrena antitijela.

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

(2.2).

Za pozitivnu kontrolu pripremiti odvojena stakalca sa homolognim sojem ili nekim drugim referentnim sojem bakterije *C. m. subsp. sepedonicus*, rastvoren u ekstraktu krompira kako je navedeno u Dodatku 2 i po izboru u puferu.

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

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

Koristiti mikroskopska stakalca sa više otvora, po mogućnosti sa 10 otvora prečnika najmanje 6 mm.

Kontrolni materijal testirati jednako kao i uzorke.

4.1. Pripremiti IF stakalca za testiranje prema jednom od sljedećih postupaka:

i) Za taloge sa relativno malo skroba:

U prvi otvor pipetom odmjeriti standardnu zapreminu (15 μ l je dovoljno za otvore prečnika 6 mm – za veće otvore povećajte zapreminu) razrjeđenja od 1/100 resuspendovanog taloga krompira. Potom u ostale otvore u istom redu pipetom odmjeriti sličnu zapreminu 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:

Pripremiti decimalna razrjeđenja (1/10, 1/100) resuspendovanog taloga u puferu za talog. U jedan red otvora pipetom odmjeriti standardnu zapreminu (15 μ l je dovoljno za otvore prečnika 6 mm – za veće otvore povećajte zapreminu) resuspendovanog 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. Ostaviti da se kapljice osuše na sobnoj temperaturi ili ih zagrijavati do temperature od 40 do 45 °C. Fiksirati bakterijske ćelije na IF stakalce bilo zagrijavanjem (15 minuta na 60 °C), provlačenjem kroz plamen, 95 %-tnim etanolom ili prema posebnim upustvima dobavljača antitijela.

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

4.3. IF postupak:

i) U skladu sa postupkom za pripremu stakalaca za testiranje kako je opisano pod 4.1(i):

Pripremiti 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) U skladu sa postupkom za pripremu stakalaca za testiranje kako je opisano pod 4.1(ii):

Pripremiti radno razrjeđenje antitijela u IF puferu. Radno razrjeđenje utiče na specifičnost.

Slika 1. Priprema stakalca u skladu sa tačkama 4.1.(i) i 4.3.(i)

Razrjeđenja resuspendovanog taloga						
	1/100	1/1	1/1	1/1	1/1	□ razrjeđenja resuspendovanog taloga
(T=titar)	T/2	T/4	T/2	T	2T	□ 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 u skladu sa tačkama 5.1. (i) i 5.3.(ii)

Radna razrjeđenja seruma/antitijela						
	1/1	1/10	1/100	prazno	prazno	□ decimalna razrjeđenja resuspendovanog taloga

Uzorak 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5
Duplikat uzorka 1 ili uzorka 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10

4.3.1. Poređati stakalca na navlaženi upijajući papir. Svaki otvor potpuno prekriti razrjeđenjem antitijela. Zapremina antitijela koji se stavlja u pojedini otvor mora biti jednaka zapremini nanesenog ekstrakta.

Slijediti sljedeći postupak ako nema posebnih upustava dobavljača antitijela:

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

4.3.3. Otresti kapljice sa svakog stakalca i pažljivo ih isperati IF puferom. Potopiti stakalca 5 minuta u IF pufer-Tween (Dodatak 3) i nakon toga u IF pufer takođe 5 minuta. Paziti da ne dođe do stvaranja aerosola ili penosa kapljica jer bi moglo doći do unakrsne kontaminacijem uzoraka. Stakalca pažljivo osušiti upijajućim papirom.

4.3.4. Posložiti stakalca na navlaženi upijajući papir. Otvore popuniti razrijeđenim FITC konjugatom koji se koristi za određivanje titra. Zapremina konjugata nanesenog na otvore mora biti jednaka zapremini nanesenog antitijela.

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

4.3.6. Otresti kapljice konjugata sa stakalca. Isperati i operati stakalca kako je prethodno opisano (4.3.3). Stakalca pažljivo osušiti.

4.3.7. Na svaki otvor pipetom nanijeti 5-10 µl 0,1 M glicerola sa fosfatnim puferom (Dodatak 3) ili sredstvo protiv izbljeđivanja koje je dostupno na tržištu i stavite pokrovno stakalce.

4.4. Očitavanje IF testa:

4.4.1. Pregledati pripremljena stakalca pod epifluorescentnim mikroskopom sa odgovarajućim filterima za ekscitaciju FITC-a, pod uljnom ili vodenom imerzijom i uvećanjem od 500-1000 x. Pregledati svaki otvor uzduž i poprijeko pod pravim uglom i duž spoljne ivice. Za uzorke u kojima je vidljiv mali broj ćelija ili ih uopšte nema pregledati najmanje 40 mikroskopskih vidnih polja.

Najprije pregledati stakalce sa pozitivnom kontrolom. Ćelije 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. Utvrditi da li su u otvorima vidljive jasno fluorescirajuće ćelije karakteristične morfologije za bakteriju *C. m. subsp. sepedonicus*. Intenzitet fluorescencije mora biti jednak ili bolji kao i kod pozitivnog kontrolnog soja pri jednakom razrjeđenju antitijela. Ćelije sa 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 ćelije zbog kontaminacije pufera ili ako su pozitivne ćelije pronađene (izvan otvora) na površini stakalca.

4.4.3. Postoji nekoliko problema vezanih za specifičnost testa imunofluorescencije. U koncentrujenom ekstraktu krompirovih isječaka ili dijelova stabljika mogu se nalaziti populacije fluorescirajućih ćelija netipične morfologije i saprofitne bakterije sa kojima dolazi do unakrsne reakcije i koje su po veličini i morfologiji slične bakteriji *C. m. subsp. sepedonicus*.

4.4.4. U obzir se uzimaju samo fluorescentne ćelije tipične veličine i morfologije u titru ili radnom razrjeđenju antitijela kako je opisano u tački u 4.3.

4.4.5. Tumačenje očitavanja IF testa:

(i) Ako se utvrdi prisustvo jasno fluorescentnih ćelija karakteristične morfologije, odrediti prosječan broj tipičnih ćelija po mikroskopskom vidnom polju i izračunati broj tipičnih ćelija po ml resuspendovanog taloga (Dodatak 4).

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

(ii) Očitavanje IF testa je negativno za uzorke koji imaju manje od 5×10^3 ćelija po ml resuspendovanog taloga pa se uzorak smatra negativnim. Nije potrebno dalje testiranje.

DIO 5. FISH TEST

Načelo

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

Napomena:

Koristiti validne oligo-probe specifične za bakteriju *C. m. subsp. sepedonicus* (Dodatak 7). Preliminarna testiranja primenom ove metode treba da omoguće ponovljivu detekciju najmanje 10^3 do 10^4 ćelija bakterije *C. m. subsp. sepedonicus* po ml koje su dodane ekstraktima uzoraka koji su u ranijim testiranjima bili negativni.

Postupak treba izvršiti na svježe pripremljenim ekstraktima uzoraka, ali se može uspješno primijeniti i na ekstraktu uzorka koji je bio čuvan sa glicerolom na temperaturi od -16 do -24 °C ili od -68 do -86 °C.

Za negativnu kontrolu upotrijebiti delove ekstrakta uzoraka koji su u ranijem testiranju na *C. m. subsp. sepedonicus* bili negativni.

Za pozitivnu kontrolu pripremiti suspenzije koje sadrže 10^5 do 10^6 ćelija/ml 0,01 M fosfatnog pufera (PB) bakterije *C. m. subsp. sepedonicus* (npr. soj NCPPB 4053, ili PD 406) iz kulture stare 3 – 5 dana (za pripremu videti Dodatak 2). Pripremiti odvojena stakalca za pozitivnu kontrolu sa homologim sojem ili nekim drugim referentnim sojem (izolatom) bakterije *C. m. subsp. sepedonicus*, rastvorenim u ekstraktu krompira, 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 testirajti primjenom iste procedure kao i uzorke.

5.1. Fiksiranje ekstrakta krompira

Sljedeći protokol se zasniva na proceduri Wullings i sar., (1998):

5.1.1. Pripremiti rastvor za fiksiranje (Dodatak 7).

5.1.2. Pipetom odmjjeriti 100 µl svakog ekstrakta uzorka u Eppendorf epruvetu i centrifugirajte 8 minuta na 7000 g.

5.1.3. Ukloniti supernatant i rastvoriti talog u 500 µl fiksativa pripremljenog najviše 24 sata. Promiješajte na centrifugalnoj miješalici i inkubirajte preko noći na 4 °C.

Alternativni fiksativ je 96 % etanol. Pri tome je potrebno rastvoriti talog u 50 µl 0,01M PB i 50 µl 96 % etanola. Promiješajte na centrifugalnoj miješalici i inkubirati na 4 °C 30 do 60 minuta.

5.1.4. Centrifugirati 8 minuta na 7000 g, ukloniti supernatant i resuspendovati talog u 75 µl 0,01M PB (Dodatak 3).

5.1.5. U otvore čistog stakalca naneti 16 µl fiksiranih suspenzija kako je prikazano na Slici 3. Na svako stakalce naneti nerazrijeđena dva različita uzorka i upotrijebiti 10 µl za pripremanje razrjeđenja 1:100 (u 0,01 M PB). Preostali fiksirani rastvor uzorka (49 µl) možete čuvati na – 20 °C nakon dodavanja jednake zapremine 96 %-tnog etanola. Ako FISH test treba ponoviti, centrifugiranjem ukloniti etanol i dodati jednaku zapreminu 0,01 PB (promiješati na centrifugalnoj miješalici).

Slika 3. Prikaz stakalca za FISH test

Uzorak 1	Prazno	Prazno	Prazno	Uzorak 2
				
Otvor 1	Otvor 2	Otvor 3	Otvor 4	Otvor 5
Uzorak 1	Prazno	Prazno	Prazno	Uzorak 2
				
Otvor 6	Otvor 7	Otvor 8	Otvor 9	Otvor 10
Pokrovno stakalce 1			Pokrovno stakalce 2	

5.1.6. Stakalca osušiti na vazduhu (ili u sušnici na 37 °C) pa ih fiksirati provlačenjem kroz plamen.

Na ovom se koraku postupak može prekinuti i nastaviti sljedeći dan. Stakalca se trebaju čuvati na sobnoj temperaturi u suvom prostoru bez prašine.

5.2. Predhibridizacija i hibridizacija

5.2.1. Pripremiti rastvor lizozima koji sadrži 10 mg lizozima (Sigma L–6876) u 10 ml pufera (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8,0). Taj se rastvor može čuvati, ali se smije samo jednom odmrznuti i otopiti. Dobro prekrijte svaki uzorak sa približno 50 µl rastvora lizozima i inkubirajte 10 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim samo jednom potopiti stakalca u demineralizovanu vodu i pažljivo osušite filter papirom.

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

5.2.2. Dehidrirajte ćelije uzastopnim jednominutnim uranjanjem u 50 %-tni, 80 %-tni i 90 %-tni etanol. Stakalca postaviti na držač i osušiti na vazduhu.

5.2.3. Pripremiti vlažnu komoru za inkubaciju tako što se dno hermetički zatvorene kutije prekriva upijajućim ili filter papirom potopljenim u 1x hybmix (Dodatak 7). Kutiju prethodno inkubirati u aparatu za hibridizaciju nukleinskih kiselina na 55 °C najmanje 10 minuta.

5.2.4. Pripremiti 45 µl po stakalcu rastvora za hibridizaciju (Dodatak 7) i prethodno inkubirati pet minuta na 55 °C.

5.2.5. Staviti stakalca na grejnu podlogu (termoblok) na 45 °C i naneti po 10 µl hibridizovanog rastvora na svaki od četiri otvora.

5.2.6. Staviti dva pokrovna stakalca (24 × 24 mm) na svako stakalce pazeći pri tom da u otvor ne ostane vazduha. Staviti stakalca u prethodno zagrijanu vlažnu komoru i hibridizujte u mraku (preko noći) u aparatu za hibridizaciju na 55 °C.

5.2.7. Pripremiti 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 inkubirati u vodenom kupatilu na 55 °C.

5.2.8. Skinuti pokrovna stakalca, a predmetna stakalca staviti na držač.

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

5.2.10. Preneti držač stakalaca u rastvor za pranje (1/2 x hybmix) i inkubirati još 15 minuta.

5.2.11. Stakalca nakratko uroniti u ultra čistu vodu pa ih staviti na filter papir. Višak vlage ukloniti filter papirom. U svaki otvor pipetom naneti 5 do 10 µl zaštitnog rastvora protiv izbljeđivanja (npr. Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA ili ekvivalentna) i cijelo predmetno stakalce pokriti velikim pokrovnim stakalcem (24 x 60 mm).

5.3. Očitavanje FISH testa

5.3.1. Stakalca odmah pregledati epifluorescentnim mikroskopom korišćenjem uljne imerzije, sa uvećanjem od 630 ili 1000 x. Sa odgovarajućim filterom za fluorescein-izotiocijanat (FITC), eubakterijske ćelije (uključujući većinu gram negativnih ćelija) se u uzorku vide kao fluorescentno zelene. Uptrebom filtera za tetrametilrodamin-5-izotiocijanat ćelije bakterije *C. m. subsp. sepedonicus*, obojene sa Cy3, vide se kao fluorescentno crvene. Uporediti morfologiju ćelije sa morfologijom pozitivnih kontrola. Ćelije moraju biti jasno fluorescentne i u cijelosti obojene. Ako dođe do odstupanja u obojenosti, FISH test (Dio 9.4) se mora ponoviti. Pregledati svaki otvor uzduž i popreko pod normalnim uglom i duž spoljne ivice. Za uzorke u kojima je vidljiv mali broj ćelija ili ih uopšte nema pregledati najmanje 40 mikroskopskih vidnih polja.

5.3.2. Uočiti da li su u otvorima vidljive jasno fluorescirajuće ćelije karakteristične morfologije za bakteriju *C. m. subsp. Sepedonicus*.

Intenzitet fluorescencije mora biti jednak ili jači nego na soju pozitivne kontrole. Ćelije koje nijesu 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 (npr. sve pločice u seriji zbog kontaminacije pufera pokazuju pozitivne ćelije ili su pozitivne ćelije pronađene izvan otvora, na površini pločice).

5.3.4. Postoji nekoliko problema vezanih uz specifičnost FISH testa. U koncentrovanom ekstraktu izdvojenih konusa pupčanih delova krtole ili stabljike uvijek se očekuje i prisustvo populacija fluorescentnih ćelija sa netipičnom morfologijom ili unakrsna reakcija sa saprofitnim bakterijama slične veličine i građe kao *C. m. subsp. Sepedonicus*, mada znatno ređe nego kod IF testa.

5.3.5. U obzir se uzimaju samo fluorescentne ćelije tipične veličine i morfologije (pogledati 5.3.2).

5.3.6. Tumačenje rezultata FISH testa:

(i) Rezultati FISH testa smatraju se važećim ako se u svim pozitivnim kontrolama i ni jednoj negativnoj kontroli primjenom FITC filtera uočavaju zelene fluorescentne ćelije čija je veličina i morfologija tipična za bakteriju *C. m. subsp. sepedonicus* i ako se primjenom filtera za rodamin uočavaju crvene fluorescentne ćelije. Ako se uoče jasno fluorescentne ćelije karakteristične morfologije, odrediti prosječni broj tipičnih ćelija po mikroskopskom vidnom polju i izračunati broj tipičnih ćelija po ml resuspendovanog taloga (Dodatak 4). Uzorci sa najmanje 5×10^3 tipičnih ćelija po ml resuspendovanog taloga smatraju se potencijalno kontaminiranim. Potrebni su dalji testovi. Uzorci sa manje od 5×10^3 tipičnih ćelija po ml resuspendovanog taloga smatraju se negativnim.

(ii) FISH test je negativan ako se primjenom filtera za rodamin ne uoče snažno fluorescentne crvene ćelije čija je veličina i morfologija tipična za bakteriju *C. m. subsp. sepedonicus*, pod uslovom da se primjenom filtera za rodamin uoče tipične snažno fluorescentne crvene ćelije u preparatima pozitivne kontrole.

DIO 6. PCR TEST

Načela

Kada se upotrebom PCR testa, kao glavnog (prvog) testa provjere, dobije pozitivan rezultat, mora se sprovesti IF test izolacija kao drugi obavezni test provjere. Kada se korišćenjem PCR testa kao drugog testa provjere dobije pozitivan rezultat, za postavljanje konačne dijagnoze potrebno je dalje testiranje prema dijagramu.

Korištenje ove metode kao glavnog testa provjere preporučuje se samo ako je dostupna specijalizovana ekspertiza.

Napomena:

Preliminarna testiranja ovom metodom treba da omoguće ponovljivu detekciju 10^3 do 10^4 ćelija bakterije *C. m. subsp. sepedonicus* po ml, koje su dodate ekstraktu uzorka koji je u prethodnim testiranjima dao negativan rezultat. Da bi se postigao najveći stepen osjetljivosti i specifičnosti u svim laboratorijima, potrebno je izvođenje oglada za optimizaciju metode.

Koristiti validne (potvrđene i odobrene) reagense i protokole za PCR. Poželjno je odabrati metod sa internom kontrolom.

Preduzeti odgovarajuće mjere opreza kako bi se izbjegla kontaminacija uzorka ciljnom DNK. Da bi se spriječila kontaminacija ciljnom DNK, PCR test treba da obavljaju iskusni stručnjaci, u specijalizovanim laboratorijima za molekularnu biologiju.

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

U PCR test treba uključiti sljedeće negativne kontrole:

- ekstrakt uzorka koji je u ranijem testiranju na *C. m. subsp. sepedonicus* bio negativan;

- pufer korišten za ekstrakciju bakterije i DNK iz uzorka;
- reakcijsku smjesu za PCR (PCR-reakcioni miks).

U PCR test treba uključiti sljedeće pozitivne kontrole:

- alikvot resuspendovanih taloga u koje je dodata bakterija *C. m. subsp. sepedonicus* (za pripremu pogledati Dodatak 2);
- suspenziju u vodi od 10^6 ćelija po ml *C. m. subsp. sepedonicus* virulentnog izolata (npr. NCPPB 2140 ili NCPPB 4053);
- ako je moguće, u PCR testu koristiti i DNK ekstrahovanu iz pozitivnih kontrolnih uzoraka.

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

S obzirom da primjena PCR protokola zahtijeva korišćenje ekstrakta uzoraka sa što manje zemlje, prije početka procedure izvođenja testa, uzorke krompira je poželjno dobro oprati.

6.1. Metode prečišćavanja DNK

Uzorke za pozitivnu i negativnu kontrolu koristiti na predhodno opisan način. Kontrolni materijal pripremite na isti način kao i uzorke.

Postoje različite metode za prečišćavanje ciljane DNK iz kompleksnih supstrata uzorka radi uklanjanja inhibitora PCR reakcije i drugih enzimskih reakcija i metode koncentrovanja ciljane DNK u ekstratu uzorka.

Sljedeća metoda je optimalna (standardizovana) za korišćenje sa validnom (potvrđenom i odobrenom) PCR metodom (Dodatku 6).

6.1.(a)Metoda prema Pastroku (2000)

1. Pipetom odmjeriti 220 μ l pufera za lizu [100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA(pH8,0)] u Eppendorf epruvetu od 1,5 ml.
2. Dodati 100 μ l ekstrakta uzorka i staviti u termoblok ili vodeno kupatilo na 95 °C 10 minuta.
3. Staviti epruvetu na led na pet minuta.
4. Dodati 80 μ l osnovnog rastvora Lysozyme (50 mg lizozima po ml u 10 mM Tris HCl, pH 8,0) i inkubirati na 37 °C 30 minuta.
5. Dodati 220 μ l rastvora Easy DNA® A (Invitrogen), dobro izmješati na centrifugalnoj miješalici i inkubirati na 65 °C 30 minuta.
6. Dodati 100 μ l Easy DNA® rastvora B (Invitrogen), snažno izmješati na vorteksu odnosno centrifugalnoj miješalici, sve dok precipitat ne bude slobodno kružio po epruveti i dok uzorak ne bude jednoliko viskozan.
7. Dodati 500 μ l hloroforma, izmješati na centrifugalnoj miješalici dok se viskozitet ne umanj i smješa postane homogena.
8. Centrifugirati na 15 000 g 20 minuta na 4 °C da se podijele faze i stvori interfaza (međufaza).
9. Prenijeti gornju fazu u novu Eppendorfov epruvetu.

10. Dodati 1 ml 100 % etanola (-20°C), kratko promiješati na centrifugalnoj miješalici i inkubirati na ledu 10 minuta.
11. Centrifugirati na 15 000 g 20 minuta na 4°C pa ukloniti etanol od taloga.
12. Dodati 500 μl 80 % etanola (-20°C) i promiješati okretanjem epruvete.
13. Centrifugirati na 15 000 g 10 minuta na 4°C , sačuvati talog, a etanol ukloniti.
14. Ostaviti talog da se suši na vazduhu ili u vakuumskoj centrifugi (DNA speed vac).
15. Resuspendovati talog u 100 μl sterilne ultra čiste vode i ostaviti na sobnoj temperaturi najmanje 20 minuta.
16. Čuvati na -20°C sve do izvođenja PCR.
17. Centrifugiranjem izdvojiti mogući bijeli precipitat (talog) i za PCR upotrijebiti 5 μl supernatanta koji sadrži DNK.

6.1.(b) Druge metode

Mogu se primijeniti druge metode za ekstrakciju DNK (npr. Qiagen DNeasy Plant Kit) ako je dokazana jednaka djelotvornost u prečišćavanju DNK iz kontrolnih uzoraka koji sadrže 10^3 do 10^4 patogenih ćelija po ml.

6.2. PCR

6.2.1. Pripremiti kalupe (uzorke) za testiranje i kontrolu za PCR prema odobrenim protokolima (Dodatak 6). Pripremiti jedno decimalno razrjeđenje ekstrakta DNK iz uzorka (1:10 u ultra čistoj vodi).

6.2.2. U nekontaminiranom prostoru pripremiti odgovarajuću reakcijsku smjesu (reakcioni miks) za PCR prema objavljenim protokolima (Dodatak 6). Odobreni PCR protokol je multipleks reakcija koja takođe uključuje unutrašnju PCR kontrolu.

6.2.3. Dodati 5 μl ekstrakta DNK na 25 μl reakcione smjese u sterilne epruvete za PCR.

6.2.4. Uključiti i uzorak za negativnu kontrolu koji sadrži samo reakcionu smjesu za PCR, a umjesto uzorka dodati isti izvor ultra čiste vode koji je korišćen za pripremu reakcione smjese za PCR.

6.2.5. Staviti epruvete u uređaj za PCR (thermal cycler) koji je korišćen u preliminarnom testiranju i pokrenuti optimalni PCR program (Dodatak 6).

6.3. Analiza PCR produkata

6.3.1. Elektroforezom u agaroznom gelu razdvojiti umnožene PCR proizvode. Najmanje 12 μl reakcione smjese umnožene DNK iz svakog uzorka, pomiješane sa 3 μl pufera za nanošenje (Dodatak 6), nanosite u 2,0 %-tni (w/v) agarozni gel u tris-acetat EDTA puferu (TAE) (Dodatak 6), uz napon od 5 do 8 V po cm. Upotrijebiti odgovarajući DNK standard (marker), npr. 100 bp ljestvicu.

6.3.2. Obojiti elektroforetske trake DNK u gelu potapanjem gela u etidijum bromid (0,5 mg/l) u trajanju 30 do 45 minuta, preduzimajući pri tome odgovarajuće mjere opreza za rad sa ovim mutagenom.

6.3.3. Obojeni gel pregledati na kratkotalasnom UV transiluminatoru (npr. $\lambda = 302 \text{ nm}$) i tražite umnožene fragmente očekivane dužine (Dodatak 6) pa ih dokumentujte.

6.3.4. Za svaki novi nalaz/slučaj provjeriti autentičnost umnoženog PCR proizvoda analizom pomoću restrikcionih enzima na preostale umnožene DNK uzorka i to inkubacijom pri optimalnoj temperaturi i u optimalnom vremenu sa odgovarajućim enzimom i puferom (Dodatak 6). Nastale fragmente razdvojiti elektroforezom u agaroznom gelu kako je predhodno navedeno i nakon bojenja etidijum bromidom na UV transiluminatoru, posmatrati karakteristični obrazac (matricu) restrikcionih fragmenata i uporediti ga sa pozitivnom kontrolom prije i poslije razdvajanja.

Tumačenje rezultata PCR testa:

PCR test je negativan ako u testiranom uzorku nije vidljiv PCR proizvod očekivane dužine koji je specifičan za bakteriju *C. m. subsp. sepedonicus*, ali je vidljiv u svim pozitivnim kontrolnim uzorcima (kod multipleks PCR-a sa prajmerima za unutrašnju kontrolu koji su specifični za biljku domaćina: u testiranom uzorku se mora umnožiti drugi proizvod PCR-a očekivane veličine).

PCR test je pozitivan ako je vidljiv PCR proizvod koji je specifičan za bakteriju *C. m. subsp. sepedonicus* i koji je očekivane dužine i restrikcionog obrasca, pod uslovom da nije umnožen u ni u jednom uzorku negativnu kontrolu. Pouzdana potvrda pozitivnog rezultata može se dobiti i ponavljanjem testa sa drugim parom PCR 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. subsp. sepedonicus* u vodi dobije očekivani proizvod, a iz pozitivnih kontrola sa *C. m. subsp. sepedonicus* u ekstraktu krompira dobiju negativni rezultati. U multipleks PCR protokolima koji se izvode upotrebom unutrašnjih PCR kontrola, smatra se da je došlo do inhibicije reakcije ako nije dobijen ni jedan od dva proizvoda.

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

DIO 7. BIOTEST

Napomena:

Preliminarno testiranje ovom metodom treba da omogući ponovljivu detekciju (otkrivanje prisustva) 10^3 do 10^4 jedinica koje stvaraju kolonije (cfu) bakterije *C. m. subsp. sepedonicus* po ml, a koje su dodate ekstraktima uzoraka koji su u ranijem testiranju bili negativni (priprema u Dodatku 2).

Najveća osjetljivost detekcije može se očekivati ako se koriste svježe pripremljeni ekstrakti uzoraka i optimalni uslovi za rast i razvoj patogena. Međutim, ova se metoda može uspješno primijeniti i sa ekstraktima koji su čuvani sa glicerolom na temperaturi od -68 do -86°C .

Neke sorte plavog patlidžana predstavljaju odličnu selektivnu podlogu za obogaćivanje,

za rast *C. m. subsp. sepedonicus*, čak i kad nema simptoma, a ujedno su i odlične kao domaćini za test potvrde.

Uslovi rasta treba da budu optimalni kako bi se smanjio rizik od dobijanja lažno negativnih rezultata.

Detalji u vezi sa gajenjem biljaka se nalaze u Dodatku 8.

7.1. Na patlidžane rasporedite svu preostalu količinu resuspendovanog taloga ostavljenog za testiranje iz dijela 3.1.6 ili 3.2.5 jednom od metoda – inokulacija zarezivanjem ili inokulacija injekcijom (detaljnije u 7.3 ili 7.4). Koristiti samo biljke plavog patlidžana u stadijumu dva do tri prava lista, do potpune razvijenosti trećeg pravog lista. Po jednom uzorku potrebno je 15 do 25 biljaka patlidžana, da bi se u potpunosti iskoristio resuspendovani talog i osigurala efikasna inokulacija.

7.2. Ne zalijevati biljke patlidžana 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) resuspendovanog taloga na stabljiku između kotiledona i prvog lista.

7.3.2. Sterilnim skalpelom napraviti dijagonalni rez, dug oko 1 cm i dubok oko 2/3 debljine stabljike, počevši od nanosene kapljice resuspendovanog taloga.

7.3.3. Čvrsto zatvoriti rez sterilnim vazelinom iz šprica.

7.4. Inokulacija injekcijom

Inokulisati stabljike patlidžana neposredno iznad kotiledona injekcijom sa tankom iglom (ne manjom od 23G). Uzorak rasporediti na testne biljke plavog patlidžana.

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

7.6. Za negativnu kontrolu, inokulisati 5 biljaka sterilnim puferom za rastvaranje taloga (sterilni pelet pufer) istom metodom inokulacije (7.3 ili 7.4).

7.7. Biljke gajiti u karantinskim prostorijama do četiri sedmice na 18 do 24 °C, uz dovoljnu količinu svjetla i visoku vlažnost (70 do 80 %) i adekvatno zalijevati kako bi se spriječilo nakupljanje vode ili uvenuće zbog nedostatka vode. Čelije *C. m. subsp. sepedonicus* se ne razvijaju (uginjavaju) na temperaturama iznad 30 °C, a optimalna temperatura je 21 °C. Da bi se izbjegla unakrsna kontaminacija, biljke pozitivne i negativne kontrole gajiti na jasno odvojenim stolovima u stakleniku ili policama u komori za rast ili u slučaju da je prostor ograničen, pobrinuti se da su biljke jasno odvojene između pojedinih postupaka u toku izvođenja procedure. Ako se biljke za različite uzorke moraju gajiti blizu jedna druge, razdvojiti ih odgovarajućim zaslonima (pogodnim olatnom). Kod prihrane, zalijevanja, pregledanja i svakog drugog postupka sa biljkama dobro pazite da ne dođe do unakrsne kontaminacije. Od ključne je važnosti da u staklenicima i komorama za gajenje ne bude nikakvih insekata jer oni mogu prenijeti bakteriju sa uzorka na uzorak.

7.8. Pojavu simptoma redovno provjeravati poslije sedam dana od. Prebrojati biljke koje pokazuju

simptome. *C. m. subsp. sepedonicus* izaziva uvenuće lišća kod patlidžana, koje može početi kao uvelost ivica ili između nerava listova. Uvenulo tkivo može u početku izgledati tamnozeleno ili prošarano, ali kasnije postaje blijedo pa nekrotično. Uvela površina između lisnih nerava često izgleda masno, kao da je natopljena vodom. Nekrotično tkivo često ima svjetložutu ivicu. Biljke ne uginu uvijek; što je period prije nego što se simptomi razviju duži, to je veća mogućnost preživljavanja. Biljke mogu prerasti zarazu. Mlade biljke patlidžana mnogo su osjetljivije na niske populacije *C. m. subsp. sepedonicus* nego starije biljke; zbog toga se koriste biljke u ili neposredno prije faze tri prava lista.

Uvenuće može biti izazvano i populacijama drugih bakterija ili gljivica koje su prisutne u ekstraktu tkiva krtola. To su: *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia carotovora subsp. carotovora* i *E. carotovora subsp. atroseptica*, *Erwinia chrysanthemi*, *Phoma exigua* var. *foveata*, kao i populacije velikog broja saprofitskih bakterija. Naročito *Erwinia chrysanthemi* može izazvati simptome na listovima i uvenuće koje je vrlo slično simptomima *C. m. subsp. sepedonicus*. Jedina razlika je pojava tamnjenja-crnjenja stabljika u slučaju infekcija bakterijom *Erwinia chrysanthemi*. Druga uvenuća se razlikuju od onih koje prouzrokuje *C. m. subsp. sepedonicus* zato što cijeli listovi ili cijele biljke vrlo brzo venu. Takođe se može pripremiti i bojenje po Gramu: time će se razlučiti *C. m. subsp. sepedonicus* od *Erwinia* spp.

7.9. Čim primijete simptomi kod patlidžana, potrebno je izvršiti ponovnu izolaciju (re-izolaciju), koristeći dijelove uvenulog tkiva lišća ili tkiva stabljike (3.1.3 maceracija tkiva). Površinski dezinfikujte lišće i stabljike patlidžana tako da ih obrišete 70 %-tnim etanolom. Provedite IF ili PCR test na soku patlidžana i izolirajte na odgovarajućoj (selektivnoj) hranjivoj podlozi (Dio 8). Može se pripremiti i bojenje po Gramu (Dodatak 9). Identifikujte prečišćene kulture moguće *C. m. subsp. sepedonicus* i potvrdite patogenost (Dio 9 i 10).

7.10. U određenim okolnostima, naročito kad uslovi za rast nijesu optimalni, moguće je da *C. m. subsp. sepedonicus* postoji kao latentna infekcija u patlidžanima čak i nakon razdoblja inkubacije do 4 tjedna. Ako se simptomi ne primijete nakon 4 dana, 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 sprovesti ponovnu izolaciju na odgovarajućoj (selektivnoj) hranjivoj podlozi, prema postupku iz Dijela 8. Identifikujte prečišćene kulture moguće *C. m. subsp. sepedonicus* i potvrdite patogenost (Dio 9 i 10).

Tumačenje rezultata biotesta.

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

Biotest je negativan ako testirane biljke nijesu zaražene bakterijom *C. m. subsp. sepedonicus*, pod uslovom da je bakterija *C. m. subsp. sepedonicus* detektovana u pozitivnim kontrolama.

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

DIO 8. IZOLACIJA *C. m. subsp. sepedonicus*

Napomena:

Dijagnoza se može potvrditi samo ako se *C. m. subsp. sepedonicus* izoluje i zatim identifikuje (Dio 9), i ako se potvrdi patogenost (Dio 10). Iako je *C. m. subsp. sepedonicus* zahtjevan organizam, može se izolovati iz simptomatskog tkiva.

Međutim, mogu ga prerasti brzo rastuće saprofitske bakterije pa su zbog toga izolacije direktno iz ekstrakta tkiva krtola ili stabljike teške (Dio 3.1.6 ili 3.2.5). Selektivnom hranjivom podlogom i odgovarajućem razrijeđenim rastvorom resuspendovanog taloga iz isječaka ili stabljika krompira moguća je direktna izolacija *C. m. subsp. sepedonicus*.

Izolacije je potrebno izvršiti iz svih krtola ili dijelova stabljike krompira sa simptomima i iz testnih patlidžana kod kojih nijesu primijećeni simptomi ali je IF/PCR test iz sastavljenog uzorka bio pozitivan (Dio 7.10). Maceriranje stabljika patlidžana treba se, prema potrebi, sprovoditi kao što je navedeno u Dijelu 3.1.3.

Za pozitivne kontrole, pripremite decimalna razrijeđenja suspenzije 10^6 cfu po ml *C. m. subsp. 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 da li je odgovarajuća za rast patogena prije nego što se upotrijebi za testiranje rutinskih uzoraka.

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

8.1. Uzgoj na selektivnoj hranjivoj podlozi

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

8.1.2. Izolacija iz nerazrijeđenog resuspendovanog taloga krompira obično ne uspije zbog teškog uzgoja *C. m. subsp. 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 preporučuje razmazati 100 μ l iz svakog uzorka (kod upotrebe petrijevih zdjelica prečnika 90 mm – prilagodite količinu za petrijeve zdjelice drugih veličina), 1/100 do 1/10 000 razrijeđene suspenzije na hranjivu podlogu MTNA ili na NCP-88 (Dodatak 5), tehnikom razmaza.

Napomena:

Alternativna strategija je da razmažete početni alikvot po 100 μ l resuspendovanog taloga krompira na prvu podlogu, a zatim istim štapićem napravite razmaz na drugu podlogu, pri čemu na drugu podlogu nanosite ostatke ekstrakta sa prve podloge.

Na kraju to ponovite sa trećom podlogom, čime dobivate sličan efekt razrjeđenja.

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

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

8.2. Prečišćavanje sumnjivih kolonija

Napomena:

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

8.2.1. Razmazom nanijeti kolonije slične *C. m. subsp. sepedonicus* na jednu od sljedećih hranjivih podloga: (sastavi su navedeni u Dodatku 5):

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

Zasijanu podlogu inkubirati na 21 °C do 24 °C do 10 dana.

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

8.2.2. Ponovno razmažite kako bi postigli čistoću.

Stopa rasta se poboljšava presijavanjem. Tipične kolonije su kremasto-bijele ili poput boje slonovače, ponekad žute, zaokružene, glatke, ispupčene, konveksno-kupolaste, sluzavo-tečne, sa cijelim rubovima i obično 1 do 3 mm u prečniku.

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

8.2.3. Identifikovati moguće kulture (Dio 9) i sprovesti test patogenosti izolata (Dio 10).

DIO 9. IDENTIFIKACIJA

Identifikovati čiste kulture vjerovatnih izolata *C. m. subsp. sepedonicus* upotrebom najmanje dva od sljedećih testova koja se zasnivaju na različitim biološkim principima.

Prema potrebi, uključiti poznate referentne sojeve za svaki test.

9.1. Nutritivni (odgajivački) i enzimatski testovi za identifikaciju

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

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

U sve testove treba uključiti poznatu kontrolu *C. m. subsp. sepedonicus*. Nutritivne i fiziološke testove treba izvoditi koristeći kulture sa hranjivog agara. Morfološka poređenja izvršiti u odnosu na kulture na hranjivom agaru sa 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% rastvora NaCl	–
Stvaranje indola	–
Aktivnost katalaze	+
Stvaranje H ₂ S	–
Korištavanje citrata	–
Rastvaranje želatina	–
Stvaranje kiselina iz glicerola	–
Stvaranje kiselina iz laktoze	– ili slaba
Stvaranje kiselina iz ramnoze	–
Stvaranje kiselina iz salicina	–
Bojenje po Gramu (Dodatak 9)	+

9.2. IF test

- (a) Pripremiti suspenziju od približno 10⁶ ćelija po ml u IF puferu (Dodatak 3).
- (b) Pripremiti dvostruka razrjeđenja rastvora odgovarajućeg seruma.
- (c) Primijeniti IF postupak (Dio 4).
- (d) IF test je pozitivan ako je IF titar kulture jednak titru pozitivne kontrole.

9.3. PCR test

- (a) Pripremiti suspenziju od približno 10⁶ ćelija po ml u ultra čistoj vodi.
- (b) Zagrijati 100 µl ćelijske suspenzije u zatvorenim epruvetama u termobloku ili vrelom

vodenom kupatilu četiri minuta na 100 °C. Prema potrebi, dodavanje svježe pripremljenog NaOH do konačne koncentracije 0,05M može ubrzati razlaganje ćelija. Do upotrebe uzorci se mogu čuvati na – 16 do – 24 °C.

(c) Upotrijebiti odgovarajuće PCR postupke za umnožavanje specifičnih fragmenata *C. m. subsp. sepedonicus* (npr. Pastrik, 2000; Dodatak 4; Li i de Boer, 1995; Mills i sar., 1997; Pastrik i Rainey, 1999; Schaad i sar., 1999.)

(d) Identifikacija *C. m. subsp. sepedonicus* je pozitivna ako su PCR proizvodi iste veličine i imaju isti polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata kao i pozitivni kontrolni soj.

9.4. Test FISH

(a) Pripremiti suspenziju od približno 10⁶ ćelija po ml u ultra čistoj vodi.

(b) Primijeniti FISH postupak (Dio 5).

(c) FISH test je pozitivan ako su postignute reakcije iz kulture i pozitivne kontrole jednake.

9.5. Profiliranje masnih kiselina (FAP)

(a) Kulturu gajiti na triptikaza-soja-agaru (Oxoid)72 sata na 21 °C (+/- 1 °C).

(b) Primijeniti odgovarajući FAP postupak (Janse, 1991; Stead, 1992).

(c) FAP test je pozitivan ako je profil moguće (testirane) kulture 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. subsp. 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 *Clavibacter spp.* između 1 do 5 %. Kod *C. m. subsp. sepedonicus* vrijednost je obično oko 5 %.

9.6. BOX-PCR

(a) Pripremiti suspenziju od približno 10⁶ ćelija po ml ultra čiste vode.

(b) Primijeniti test u skladu sa postupkom (Smith i sar., 2001).

DIO 10. TEST PROVJERE PATOGENOSTI

Test provjere patogenosti se mora sprovesti za konačno potvrđivanje prisustva *C. m. subsp. sepedonicus* i za procjenu virulentnosti kultura identifikovanih kao *C. m. subsp. sepedonicus*:

10.1. Pripremiti inokulum od približno 10⁶ ćelija po ml iz kultura izolata koji se testira starosti tri dana i odgovarajući soj pozitivne kontrole *C. m. subsp. sepedonicus*.

10.2. Inokulisati stabljike 5 do 10 mladih sejanaca plavog patlidžana u fazi 3 prva lista (Dio 7.3 ili 7.4).

10.3. Inokulisane sejanice inkubirajte na 18 do 24 °C uz dovoljnu količinu svjetla i visoku relativnu vlažnost i adekvatno zalijevati kako bi izbjeglo nakupljanje vode ili stres od suše (Dio 7.7). Kod inokulacije čistim kulturama, tipično uvenuće se pojavljuje u roku od dve nedjelje, ali biljke koje ne pokazuju simptome (Dio 7.8) nakon tog vremena, treba inkubirati još nedelju dana na temperaturama koje su povoljne za rast patlidžana, ali ne višim od 25 °C (Dodatak 8). Ako

simptomi nijesu prisutni ni posle tri sedmice, kultura se ne može potvrditi kao patogeni oblik *C. m. subsp. sepedonicus*.

10.4. Izolaciju iz biljaka sa simptomima izvršiti odstranjivanjem dijela stabljike dužine 2 cm iznad mjesta inokulacije koji se zatim usitni i suspenduje (rastvori) u maloj količini sterilne destilovane vode ili 50 mM fosfatnom puferu (Dodatak 3). Izolovati patogen iz suspenzije razmazom na MTNA i YPGA (Dodatak 5), inkubirati tri do pet dana na 21 do 23 °C i pregledati da li su formirane tipične kolonije bakterije *C. m. subsp. sepedonicus*.

Dodatak 1

Laboratorije koji su uključene u optimizaciju i validaciju protokola

Laboratorija ¹	Lokacija	Država
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Beč i Linz	Austrija
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	Holandija
Norwegian Crop Research Institute, Plant Protection Centre	Aas	Norveška
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lisabon	Portugal
Nacionalni institut za biologijo	Ljubljana	Slovenija
Centro de Diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	Španija

Dodatak 2

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

- Napraviti suspenziju kulture virulentnog soja bakterije *C. m. subsp. sepedonicus* (NCPBPB 4053 ili PD 406) gajenog 72 sata na MTNA osnovnoj hranjivoj podlozi u 10 mM fosfatnom puferu, da se dobije gustina ćelija od približno 1 do 2 × 10⁸ cfu po ml. To je obično slabo mutna suspenzija optičke gustine od 0,20 na 600 nm.

- Izvaditi konus pupčanog dijela (isječke) iz 200 krtola krompira sorte sa bijelom korom za koje je poznato da nijesu zaraženi bakterijom *C. m. subsp. sepedonicus*.
- Obraditi konuse uobičajenom metodom i resuspendovati talog u 10 ml.
- Pripremiti 10 sterilnih mikroeproveta od 1,5 ml sa 900 µl resuspendovanog taloga.
- U prvu mikroeprovetu dodati 100 µl suspenzije *C. m. subsp. Sepedonicus* i izmješati na centrifugalnoj miješalici (vorteksu).
- U sljedećih pet mikroeproveta pripremiti decimalna razrjeđenja bakterijske suspenzije.
- Ovih šest mikroeproveta sa kontaminiranim ekstraktom koristiti za pozitivnu kontrolu. Četiri mikroeprove sa nekontaminiranim ekstraktom koristiti za negativnu kontrolu. U skladu sa tim, označiti mikroeprove.
- Pripremiti alikvot od 100 µl u mikroeprevetama od 1,5 ml tako da dobijete devet kopija svakog kontrolnog uzorka. Do upotrebe čuvati ih na – 16 do – 24 °C.
- Prisutnost i količinu *C. m. subsp. sepedonicus* u kontrolnim uzorcima najprije potvrditi IF testom.
- Za PCR test, izvršiti ekstrakciju DNK na pozitivnim i negativnim kontrolnim uzorcima za svaku seriju uzoraka za testiranje.
- Za IF i FISH testove, izvršiti testiranje na pozitivnim i negativnim kontrolnim uzorcima za svaku seriju uzoraka za testiranje.
- Kod IF, FISH i PCR testova, bakterija *C. m. subsp. sepedonicus* se mora detektovati u najmanje 10^6 i 10^4 ćelija/ml pozitivnih kontrola i ni u jednoj negativnoj kontroli.

Dodatak 3 Puferi za postupke testiranja

Napomena: Sterilizovani puferi koji nijesu otvarani mogu se čuvati do jedne godine.

1. Puferi za postupak ekstrakcije

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

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

- Na_2HPO_4 (bezvodni) 4,26 g

- KH_2PO_4 2,72 g

Destilovana voda 1 L

Rastvoriti sastojke, provjeriti pH i sterilisati u autoklavu na 121 °C 15 minuta.

Mogu biti korisni i sljedeći dodatni sastojci:

	Namjena	Količina (po L)
Pahuljice Lubrol	Deflokulant*	0,5 g

DC silikon protiv stvaranja pjene	sredstvo protiv stvaranja pjene *	1,0 ml
Tetranatrijev pirofosfat	Antioksidant	1,0 g
Polivinilpirolidon-40000 (PVP-40)	Vezanje PCR inhibitora	50 g
*Za upotrebu kod metode ekstrakcije homogenizacijom		

1.2. Pelet pufer (Pufer za rastvaranje taloga-10 mM fosfatni pufer, pH 7,2)

Ovaj pufer se koristi za resuspendovanje i razrjeđivanje ekstrakta isječaka (konusa izvađenih iz pupčanih dijelova) krtole krompira, nakon koncentrovanja 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
- Destilovana voda 1 L

Rastvoriti sastojke, provjeriti pH i sterilizovati u autoklavu na 121 °C 15 minuta.

2. Puferi za IF test

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

Ovaj se pufer koristi za razrjeđivanje antitijela.

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ 2,7 g
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0,4 g
- NaCl 8,0 g
- Destilovana voda 1 L

Rastvoriti sastojke, provjeriti pH i sterilisati u autoklavu na 121 °C 15 minuta.

2.2. IF pufer – Tween

Ovaj se pufer koristi za ispiranje IF stakalaca.

IF puferu dodajte 0,1 % Tween 20.

2.3. Fosfatni pufer sa glicerolom, pH 7,6

Ovaj pufer se koristi kao tečnost (rastvor) za prekrivanje otvora u IF testu kako bi se pojačala fluorescencija.

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ 3,2 g
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0,15 g
- Glicerol 50 ml
- Destilovana voda 100 ml

Pokrivni rastvori protiv izbljeđivanja dostupni su na tržištu, npr. Vectashield® (Vector Laboratories) ili Citifluor® (Leica).

Dodatak 4

Određivanje stepena kontaminacije u IF i FISH testovima

1. Izbrojati prosječan broj tipičnih fluorescentnih ćelija po vidnom polju (c)
Izračunati broj tipičnih fluorescentnih ćelija po otvoru mikroskopskog stakalca (C)

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

gdje je

S = površina otvora stakalca sa više otvora, i

s = površina polja objektiva.

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

gdje je

i = koeficijent polja (varira od 8 do 24 zavisno od tipa okulara)

K = koeficijent tubusa (1 ili 1,25)

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

Izračunati broj tipičnih fluorescentnih ćelija po ml resuspendovanog taloga (N)

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

gdje je

y = zapremina resuspendovanog taloga na svakom otvoru i

F = faktor razrjeđenja resuspendovanog taloga.

Dodatak 5

Hranjive podloge za izolaciju i gajenje *C. m. subsp. sepedonicus*

(a) Osnovne hranjive podloge

Hranjivi agar (NA)

Hranjivi agar (Difco) 23,0 g

Destilovana voda 1,0 L

Rastvoriti sastojke i sterilizovati u autoklavu na 121 °C 15 minuta.

Hranjivi agar sa dekstrozom (NDA)

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

Agar sa 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

Destilovana voda 1,0 L

Rastvoriti sastojke i sterilizovati u autoklavu na 121 °C 15 minuta.

Agar sa ekstraktom kvasca i mineralnim solima (YGM)

Bacto ekstrakt kvasca (Difco) 2,0 g

D(+) glukoza (monohidrat) 2,5 g

- K₂HPO₄ 0,25 g

- KH₂HPO₄ 0,25 g

- MgSO₄·7H₂O 0,1 g

- MnSO₄·H₂O 0,015 g

- NaCl 0,05 g

- FeSO₄·7H₂O 0,005 g

- Bacto agar (Difco) 18 g

- Destilovana voda 1 L

Rastvoriti sastojke i sterilisati 0,5 litara zapremine hranjive podloge u autoklavu na 121 °C 15 minuta.

(b) Validne 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_2PO_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
- Destilovana voda 1,0 L

Rastvoriti sastojke, podesiti pH na 7,2. Nakon sterilizacije u autoklavu (na 121 °C 15 minuta) i hlađenja na 50 °C, dodati antibiotike: trimetoprim 0,06 g, nalidiksilnu kiselinu 0,002 g, amfotericin B 0,01 g.

Osnovni rastvori antibiotika: trimetoprim (Sigma) i nalidiksilna kiselina (Sigma) (oba na 5 mg/ml), u 96 %-tnom metanolu, amfotericin B (Sigma) (1 mg/ml) u dimetilsulfoksidu. Osnovni rastvori su sterilizovani filtriranjem.

Napomena:

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

NCP-88

- Hranjivi agar (Difco) 23 g
- Ekstrakt kvasca (Difco) 2 g
- D-manitol 5 g
- K_2HPO_4 2 g
- KH_2PO_4 0,5 g
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,25 g
- destilovana voda 1 L

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

Pripremiti osnovne rastvore antibiotika: nalidiksilna kiselina u 0,01 M NaOH, cikloheksimid u 50 % etanolu, polimiksin B sulfat u destilovanoj vodi. Osnovni rastvori su sterilisani filtriranjem.

Napomena:

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

Dodatak 6

Validni (potvrđeni i odobreni) protokoli i reagensi za PCR

Napomena:

Preliminarna testiranja treba da omoguće ponovljivu detekciju 10^3 do 10^4 ćelija bakterije *C. m. subsp. sepedonicus* po ml ekstrakta uzorka.

Tokom preliminarnih testiranja ne smije doći do pojave lažno pozitivnih rezultata kod odabranih bakterijskih sojeva.

1. Protokol za multipleks PCR sa unutrašnjom PCR kontrolom (Pastrik, 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 dužina umnoženog proizvoda iz kalupa DNK *C. m. subsp. sepedonicus* = 502 pb (par prajmera PSA).

Očekivana dužina umnoženog proizvoda iz 18S rRNA unutrašnje kontrole = 377 pb (par prajmera NS).

1.2. PCR reakcioni miks (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
Prajmer PSA-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Prajmer PSA-R (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Prajmer NS-7-F (10 µM) ²	0,1 µl	0,04 µM
Prajmer NS-8-R (10 µM) ²	0,1 µl	0,04 µM
Taq polimeraza (5 U/µl) ¹	0,2 µl	1,0 U
Zapremina uzorka	5,0 µl	
Ukupna zapremina	25,0 µl	

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

²Koncentracija prajmera NS-7 F i NS-8-R je bila optimalna za ekstrakciju iz pupčanog konusa (isječaka) krompira metodom homogenizacije i prečišćavanja DNK prema Pastroku (2000) (Dio 6.1.a i 6.2).

Ako se upotrijebi ekstrakcija trešenjem ili neka druga metoda izolacije DNK, potrebno je izvršiti ponovnu optimizaciju koncentracije reagensa.

1.3. Uslovi PCR reakcije

Izvesti sljedeći program:

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

Napomena:

Optimalni uslovi korišćenja ovog programa su definisani za korišćenje PCR MJ Research PTC 200 thermal cycler. Modifikacija trajanja koraka ciklusa (ii), (iii) (iv), (v), (vi) i (vii) je vjerovatno potrebna u slučaju upotrebe drugih modela thermal cycler-a.

1.4. Analiza proizvoda umnožavanja restrikcionim enzimom

PCR proizvodi umnoženi iz DNK bakterije *C. m. subsp. sepedonicus* daju karakteristične polimorfizme u dužini restrikcionih fragmenata sa enzimom Bgl II nakon inkubacije na 37 °C 30 minuta. Restrikcioni fragmenti dobijeni iz specifičnoga fragmenta *C. m. subsp. sepedonicus* su veličine 282 bp i 220 bp.

2. Priprema pufera za nanošenje

2.1. Bromfenol plavilo (10 %-tni osnovni rastvor)

Bromfenol plavilo 5 g

Destilovana voda (bidestilovana) 50 ml

2.2. pufer za nanošenje

Glicerol (86 %) 3,5 ml

Bromfenol plavilo (5.1) 300 µl

Destilovana voda (bidestilovana) 6,2 ml

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

Tris pufer 48,4 g

Ledena octena kiselina 11,42 ml

EDTA (dinatrijeva sol) 3,72 g

Destilovana voda 1,00 L

Razrijedite do 1× prije upotrebe.

Dostupan je i na tržištu (npr. Invitrogen ili zamjena).

Dodatak 7
Validni (potvrđeni i odobreni) 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. Rastvor za fiksiranje

(UPOZORENJE! RASTVOR ZA FIKSIRANJE SADRŽI PARAFORMALDEHID KOJI JE TOKSIČAN. NOSITI RUKAVICE I NE UDISATI GA. PREPORUČUJE SE RAD U DIGESTORU.)

(i) Zagrijati 9 ml vode za upotrebu u procedurama molekularne biologije (npr. ultra čista voda) na oko 60 °C i dodajte 0,4 g paraformaldehida. Paraformaldehid se rastvara nakon dodavanja 5 kapi 1N NaOH i promiješate na magnetnoj miješalici.

(ii) Podesiti pH na 7,0 dodajući 1 ml 0,1M fosfatnog pufera (PB; pH 7,0) i 5 kapi 1N HCl. Indikator trakom provjeriti vrijednost pH i ako je potrebno podesiti pH pomoću HCl ili NaOH. (UPOZORENJE! U RASTVORIMA SA PARAFORMALDEHIDOM NE UPOTREBLJAVATI pH METAR)

(iii) Profiltrirati rastvor kroz membranski filter od 0,22 µm pa je do dalje upotrebe čuvati na 4 °C i zaštititi od prašine.

(iv) Napomena:

Alternativni rastvor 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
Razrijediti do 1x prema potrebi.

4. Rastvor za hibridizaciju

1x Hybmix
Natrijev dodecil sulfat (SDS) 0,01 %
Proba EUB 338 5 ng/µl
Proba CMSCY301 5 ng/µl
Pripremiti količine rastvora za hibridizaciju prema sljedećoj tabeli. Za svako stakalce (sa 2 različita uzorka u duplikatu) treba 90 µl rastvora za hibridizaciju.

Predložene količine za pripremanje smjese za hibridizaciju

	2 stakalca	8 stakalaca
--	------------	-------------

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
Ukupna zapremina (μl)	90,0	360,0

Napomena:

Čuvati sve rastvore koji sadrže oligo-probe osjetljive na svjetlost u mraku na –20 °C.
Zaštiti od direktne sunčeve svjetlosti ili električne rasvjete tokom upotrebe.

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

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

Rastvoriti sastojke, provjeriti pH i sterilisati u autoklavu na 121 °C 15 minuta.

Dodatak 8 **Gajenje plavog patlidžana**

Posijati sjeme plavog patlidžana (*Solanum melongena*) u pasterizovanom kompostu za sjeme.

Presaditi sejance sa potpuno razvijenim kotiledonima (10 do 14 dana) u pasterizovan kompost u saksijama.

Plavi patlidžan bi trebao da se gaji u stakleniku pod sljedećim uslovima:

Dužina dana: 14 sati ili prirodna dužina dana, ako je duža od 14 sati;

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

- Rastvoriti 2 g kristal violeta u 20 ml 95 %-tnog etanola.
- Rastvoriti 0,8 g amonij-oksalata u 80 ml destilovane vode.

Pomiješati dva rastvora.

Lugolov rastvor

- Jod 1 g
- Kalij-jodid 2 g
- Destilovana voda 300 ml

Usitniti sastojke koristeći tučak i avan. Dodati sastojke vodi i promućkajte odnosno promiješati da se rastvore u zatvorenoj posudi.

Rastvor šafranina za kontrast
Osnovni rastvor:

- Šafranin O 2,5 g
- 95 %-tni etanol 100 ml

Promiješati i čuvati.

Razrijedite: 1:10 da bi se dobio radni rastvor.

Postupak bojenja:

- 1) pripremiti razmaze, osušiti na vazduhu i fiksirati zagrijavanjem.;
- 2) prelići stakalce rastvorom kristal violeta jedan minut;
- 3) kratko isprati tekućom vodom;
- 4) prelići Lugolovim rastvorom jedan minut;
- 5) isprati tekućom vodom i osušiti filter-papirom;
- 6) ukloniti boju 95 %-tnim etanolom, koji se dodaje kap po kap, dok se sva boja ne ukloni ili uroniti razmaz na 30 sekundi i lagano protresti;
- 7) isprati tekućom vodom i osušiti filter-papirom;
- 8) prelići rastvorom šafranina 10 sekundi i
- 9) isprati tekućom vodom i osušiti filter-papirom.

Gram pozitivne bakterije se boje ljubičasto-plavo, a Gram negativne bakterije se boje ružičasto-crveno.

LITERATURA

- 1) Anonymous, 1987. Scheme of the detection and diagnosis of the ring rot bacterium *Corynebacterium sepe-donicum* 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 sepe-donicum* 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 [Hrsg.]. — 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.

PRIOLOG 2

MJERE KOJE SE SPROVODE U SIGURNOSNOJ ZONI

1. Mjere na mjestima proizvodnje koja su označena kao zaražena:

1.1 Na parceli koja je označena kao zaražena:

1.1.1 za vrijeme od najmanje tri uzgojne godine posle godine u kojoj je utvrđena zaraza:

- obavezno je uklanjanje samoniklih biljaka krompira i drugih biljaka domaćina štetnog organizma; i
- zabranjena je sadnja krtola i biljaka, kao i sjetva sjemena krompira u botaničkom smislu, kao i sjetva i sadnja drugih biljaka domaćina štetnog organizma ili usjeva za koje je utvrđeno da omogućuju širenje štetnog organizma;

a) u prvoj sezoni proizvodnje krompira koja slijedi posle perioda iz podtačke 1.1.1., pod uslovom da na polju najmanje dvije uzastopne uzgojne godine prije sadnje tokom sprovođenja sistemskog istraživanja nijesu nađene samonikle biljke krompira i druge biljke domaćini, dopušta se proizvodnja isključivo merkantilnog krompira, uz testiranje krtola u skladu sa propisanim postupkom;

b) u sezoni proizvodnje krompira koja slijedi nakon sezone iz podtačke a) dopušta se, uz odgovarajući plodored, koji mora biti najmanje dvogodišnji za proizvodnju sjemenskog krompira, proizvodnja sjemenskog ili merkantilnog krompira, uz sprovođenje sistemskog istraživanja iz člana 3 ovog pravilnika ili

1.1.2 tokom četiri uzgojne godine koje slijede nakon godine u kojoj je zaraza utvrđena:

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

U prvoj sezoni proizvodnje krompira koja slijedi nakon perioda iz podtačke 1.1.2, pod uslovom da tokom sprovođenja sistemskog istraživanja u najmanje dvije uzastopne uzgojne godine prije sadnje na polju nijesu nađene samonikle biljke krompira i druge samonikle biljke domaćini, dopušta se proizvodnja sjemenskog ili merkantilnog krompira, uz testiranje izvađenih krtola u skladu sa propisanim postupkom;

1.2 Na ostalim poljima unutar zaraženog mjesta proizvodnje pod uslovom da je fitosanitarni inspektor utvrdio da je otklonjen rizik od samoniklih biljaka krompira, kao i drugih biljaka domaćina štetnog organizma:

1.2.1 u uzgojnoj godini koja slijedi nakon godine u kojoj je zaraza utvrđena:

- zabranjuje se sadnja krtola i biljaka krompira, kao i sjetva sjemena krompira u botaničkom smislu ili drugih samoniklih biljaka domaćina štetnog organizma; ili se
- dopušta sadnja sertifikovanog sjemenskog krompira namijenjenog isključivo proizvodnji merkantilnog krompira;

1.2.2 u drugoj uzgojnoj godini koja slijedi nakon godine u kojoj je zaraza utvrđena, dopušta se sadnja samo sertifikovanog sjemenskog krompira ili sjemenskog krompira za koji je službenim testiranjem potvrđeno da nije zaražen štetnim organizmom i da je proizveden pod stručnim nadzorom na mjestima proizvodnje koja nijesu označena kao zaražena, za sjemensku ili merkantilnu proizvodnju;

1.2.3 najmanje još u trećoj uzgojnoj godini koja slijedi nakon godine u kojoj je utvrđena zaraza dopušta se sadnja samo sertifikovanog sjemenskog krompira ili sjemenskog krompira proizvedenog pod stručnim nadzorom iz sertifikovanog sjemenskog krompira, za sjemensku ili merkantilnu proizvodnju;

1.2.4 u svakoj uzgojnoj godini iz podtačke 1.2.1, 1.2.2 i 1.2.3 ove tačke, preduzimaju se mjere uklanjanja samoniklih biljaka krompira i drugih biljaka domaćina štetnog organizma ako su prisutne i sprovodi se službeno testiranje izvađenog krompira sa svakog polja u skladu sa propisanim postupkom.

1.3 Odmah nakon utvrđivanja zaraze štetnim organizmom i nakon sljedeće uzgojne godine, svi uređaji, oprema i skladišni prostori na mjestu proizvodnje koji su se koristili u proizvodnji krompira moraju se očistiti i dezinfikovati primjenom odgovarajućih postupaka u skladu sa članom 11 ovog pravilnika.

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

- zabranjuje se sadnja krtola i biljaka krompira, kao i sjetva sjemena krompira u botaničkom smislu, sve dok se u tom zaštićenom prostoru, pod nadzorom fitosanitarnog inspektora, ne sprovedu mjere uništavanja štetnog organizma i ukloni sav biljni materijal koji potiče od biljaka domaćina, pri čemu se, kao minimalna mjera, obavezno sprovodi potpuna zamjena supstrata za uzgoj kao i čišćenje i dezinfekcija proizvodne jedinice i cjelokupne opreme, i sve dok nakon toga fitosanitarni inspektor ne odobri proizvodnju krompira; i
- dopušta se sadnja isključivo sertifikovanog sjemenskog krompira ili mini-krtola ili mikro biljaka dobijenih iz kulture biljnog tkiva, koje potiču iz testiranih izvora.

2. Mjere u čitavoj sigurnosnoj zoni:

2.1 Odmah nakon utvrđivanja zaraze fitosanitarni inspektor naređuje, prema potrebi, čišćenje i dezinfekciju svih uređaja, opreme i skladišnih prostora koji su se koristili na takvim posjedima u proizvodnji krompira primjenom odgovarajućih postupaka u skladu sa članom 12 ovog pravilnika.

2.2 Odmah i tokom najmanje tri uzgojne godine koje slijede iza one u kojoj je zaraza utvrđena, fitosanitarni inspektor:

- nadzire posjede na kojima se uzgajaju, skladište, nalaze ili dorađuju krtole krompira, uključujući i posjede sa kojih i na kojima su se koristili uređaji za obavljanje radnji u vezi sa nabrojanim djelatnostima;
- unutar cijele sigurnosne zone naređuje sadnju isključivo sertifikovanog sjemenskog krompira ili sjemenskog krompira proizvedenog pod stručnim nadzorom i testiranje nakon vađenja onog sjemenskog krompira koji je gajen na mjestima proizvodnje koja se smatraju vjerovatno zaraženim, u skladu sa članom 7 ovog pravilnika;
- naređuje da se na svim posjedima unutar tog područja sa proizvedenim sjemenskim krompirom postupa odvojeno od merkantilnog krompira, ili da se obavi čišćenje i dezinfekcija između postupanja sa sjemenskim i merkantilnim krompirom;
- sprovodi sistematska istraživanja iz člana 3 ovog pravilnika.

2.3 U slučaju potrebe, Fitosanitarna uprava može pripremiti program zamjene svih zaliha sjemenskog krompira u odgovarajućem vremenskom razdoblju.