

На основу члана 43. став 2. Закона о здрављу биља („Службени гласник РС”, број 41/09),

Министар пољопривреде, шумарства и водопривреде доноси

ПРАВИЛНИК

о мерама за откривање, спречавање ширења и сузбијање штетног организма *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. spp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al. проузроковача прстенасте трулежи кртола кромпира, начину одређивања граница зараженог, угроженог и подручја без штетних организама, условима за окончање наложених мера, као и начину обавештавања о предузетим мерама и престанак мера

„Службени гласник РС”, број 103 од 11. децембра 2009.

I. ОСНОВНЕ ОДРЕДБЕ

Члан 1.

Овим правилником прописују се мере за откривање, спречавање ширења и сузбијање штетног организма *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. Spp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., проузроковача прстенасте трулежи кртола кромпира, начин одређивања граница зараженог, угроженог и подручја без штетног организма, условима за окончање наложених мера, као и начину обавештавања о предузетим мерама и престанак мера.

II. МЕРЕ ОТКРИВАЊА ШТЕТНОГ ОРГАНИЗМА

Члан 2.

Ради откривања штетног организма *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. Spp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., проузроковача прстенасте трулежи кртола кромпира (у даљем тексту: штетни организам) спроводи се посебан надзор над штетним организмом који обухвата прегледе биљака и кртола кромпира (*Solanum tuberosum* L.) и прегледе прописаних објеката.

Број, порекло, метод и време узимања узорака приликом прегледа биљака и кртола кромпира и прописаних објеката одређује се у зависности од специфичних система производње кромпира и биологије штетног организма.

Члан 3.

При прегледу биљака кромпира у пољу у току вегетације врши се визуелни преглед на присуство штетног организма, узимају се узорци биљака и достављају овлашћеној лабораторији (у даљем тексту: лабораторија) ради лабораторијског испитивања.

При прегледу кртола кромпира, узимају се узорци кртола семенског кромпира и осталог кромпира који није намењен садњи (у даљем тексту: меркантилни кромпир), првенствено из лотова у складиштима и дистрибутивним центрима ради обављања визуелног прегледа сечењем кртола, односно достављања лабораторији ради лабораторијског испитивања.

Семенски кромпир мора да потиче директно од материјала произведеног у складу са званичним програмом контроле и за који је лабораторијским испитивањем утврђено да није заражен штетним организмом.

Лабораторијско испитивање из ст. 1. и 2. овог члана спроводи се у складу са међународно прихваћеним процедурама на начин описан у Прилогу овог правилника – Шема тестирања за дијагностику, детекцију и идентификацију проузроковача прстенасте трулежи кромпира (у даљем тексту: Прилог), који је одштампан уз овај правилник и чини његов саставни део.

Члан 4.

Сумња на појаву штетног организма постоји ако су визуелно уочени типични симптоми болести или је резултат једног од брзих тестова провере (сцреенинг тест) позитиван.

Да би се потврдила или отклонила сумња на појаву штетног организма, спроводе се даља лабораторијска испитивања на начин описан у Прилогу од стране овлашћене лабораторије.

Приликом спровођења лабораторијских испитивања на одговарајући начин чувају се узорковане кртоле и, када је то могуће, узорковане биљке, преостали екстракт и додатно припремљен материјал за брзе тестове провере (screeningtestа), нпр. стакалца за имунофлуоресценцију и сву релевантну документацију.

Сачувани узорак кртола омогућава и испитивање сортности у случајевима када је то потребно.

Када је лабораторијским испитивањем потврђено присуство штетног организма, најмање месец дана од дана потврђене заразе чува се на одговарајући начин узорак вештачки заражених тест биљака плавог патлиџана и изолована култура штетног организма.

Члан 5.

У случају сумње на појаву штетног организма, предузимају се следеће мере:

- 1) забрана премештања свих лотова или пошиљака кромпира из којих су узети узорци;
- 2) додатне превентивне мере ради спречавања ширења штетног организма, у зависности од процењеног степена ризика.

Додатне превентивне мере из става 1. тачка 2) овог члана могу укључити надзор над премештањем свих осталих кртола или биљака повезаних са сумњивом појавом, унутар и ван објеката, ограничавање употребе могуће заражених машина и опреме.

Члан 6.

Ако држалац биља, биљних производа и прописаних објеката или било која друга особа уочи симптоме заразе или посумња на појаву штетног организма, обавезан је да о томе одмах обавести Министарство.

III. НАЧИН ОДРЕЂИВАЊА ГРАНИЦА ЗАРАЖЕНОГ, УГРОЖЕНОГ И ПОДРУЧЈА БЕЗ ШТЕТНОГ

ОРГАНИЗМА, МЕРЕ ЗА СПРЕЧАВАЊЕ ШИРЕЊА И СУЗБИЈАЊЕ ШТЕТНОГ ОРГАНИЗМА И УСЛОВИ

ЗА ОКОНЧАЊЕ НАЛОЖЕНИХ МЕРА

Начин одређивања граница зараженог, угроженог и подручја без штетног организма

Члан 7.

Када се на основу резултата лабораторијског испитивања потврди присуство штетног организма одређују се границе зараженог, угроженог или подручја без штетног организма, тако што се:

- 1) означава као заражене кртоле или биљке, пошиљке, односно лотови, машине, превозна средства, складишта или њихови делови и други објекти и предмети, укључујући и материјал за паковање, из којих је сваки од узорака узет, као и места производње и парцеле са којих потичу биљке и кртоле;
- 2) одређује обим могуће заразе евидентирањем чињеница о свим контактима у производном процесу са извором заразе (пре и после вађења кртола) у циљу одређивања обима могуће заразе и ширења штетног организма;
- 3) разграничава заражено, угрожено и подручје без штетног организма на основу означене и потврђене заразе, обима могуће заразе, као и могућег ширења штетног организма.

Члан 8.

Одређивање обима могуће заразе врши се евидентирањем:

- 1) кртола или биљака произведених на месту производње које је означено као заражено;
- 2) других места производње која су у било каквој вези са кртолама или биљкама које су означене као заражене, као и заједнички коришћене опреме и објеката;
- 3) кртола или биљака које су произведене на местима производње из тачке 2) овог члана или су се налазиле на тим местима истовремено са кртолама и биљкама које су означене као заражене;
- 4) простора и објеката у којима се обавља манипулација кромпира који потиче са места производње из тач. 1) до 3) овог члана;
- 5) машина, превозних средстава, складишта или њихових делова, као и других објеката или предмета, укључујући и материјал за паковање, који су могли да дођу у додир са кртолама или биљкама које су означене као заражене;
- 6) кртола или биљака које су биле ускладиштене или у додиру са неким од прописаних објеката или са предметима из тачке 5) овог члана, пре њиховог чишћења и дезинфекције;
- 7) кртола или биљака које се сматрају могуће зараженим због клонске повезаности са кртолама или биљкама које су означене као заражене, иако су резултати тестирања негативни. Спроводи се и тест сортности да би се проверио идентитет заражених и клонски сродних кртола или биљака кромпира;

8) места производње кртола или биљака из тачке 7) овог члана.

Одређивање могућег ширења штетног организма врши се на основу близине других места производње кромпира и других биљака домаћина, као и заједничке производње и употребе залиха семенског кромпира.

Члан 9.

Партије кромпира које су клонски сродне са кртолама или биљкама које су означене као заражене подлежу обавезном лабораторијском испитивању, у складу са Прилогом.

Мере за спречавање ширења и сузбијање штетног организма

Члан 10.

Кртоле или биљке које су означене као заражене се уништавају, односно спаљују или на други начин одлажу на месту за одлагање отпада на коме не постоји ризик од ширења штетног организма.

Ако је утврђено да не постоји ризик од ширења штетног организма кртоле или биљке које су означене као заражене могу се употребљавати и то:

- 1) као храна за животиње после термичке обраде на начин који не оставља никакву могућност преживљавања штетног организма;
- 2) индустријски прерађивати, под условом да се директно допреме до места прераде на коме постоји опрема за одлагање отпада чијим коришћењем је отклоњена опасност од ширења штетног организма и које има систем за чишћење и дезинфекцију превозних средстава која напуштају место прераде;
- 3) подвргавати и другим мерама под условом да нема опасности од ширења штетног организма.

Члан 11.

Кртоле или биљке које се сматрају могуће зараженим штетним организмом и кртоле или биљке кромпира које су клонски повезане са онима које су означене као заражене без обзира на резултате тестирања не смеју се користити за садњу, већ се могу:

- 1) употребити као меркантилни кромпир намењен исхрани, при чему кромпир мора да буде пакован на местима која располажу одговарајућом опремом за одлагање отпада и који је пакован за директну испоруку без препакивања. Са семенским кромпиром дозвољено је руковати на тим истим местима само ако се ради одвојено или након чишћења и дезинфекције, или
- 2) употребити као меркантилни кромпир намењен индустријској преради, уз директну и брзу испоруку до погона за прераду, који мора да располаже одговарајућом опремом за одлагање отпада и системом за чишћење и дезинфекцију превозних средстава која напуштају место прераде, или

3) употребити или одложити на неки други начин под условом да нема опасности од ширења штетног организма.

Члан 12.

Отпад који је настао као резултат спровођења мера из чл. 10. и 11. овог правилника и отпад који настаје током руковања, одстрањивања и прераде заражених партија кромпира одлаже се тако да се избегне свака опасност од ширења штетног организма, и то:

1) отпаци кромпира (укључујући одбачени кромпир и кору) и сви други чврсти отпаци који су у вези с кромпиром (укључујући земљу, камење и друге остатке) уклањају се на следећи начин:

– одлагањем на за то службено одобреном месту, на којем не постоји опасност од неконтролисаног ширења штетног организма у околину, нпр. испирањем кроз поре земље до пољопривредног земљишта. Отпаци се превозе директно до одређеног места у затвореном превозном средству тако да не постоји опасност од губитка отпада,

– спаљивањем,

– применом неке друге мере за које је утврђено да не постоји опасност од ширења штетног организма;

2) течни отпад настао у преради који садржи чврсте честице се филтрира или обрађује поступком седиментације ради уклањања чврстих честица које на начин из става 1. тачка 1) овог члана.

Течни део отпада неопходно је:

1) загрејати на температури од најмање 60°C у трајању најмање 30 минута или

2) одстранити под службеним надзором на начин који онемогућава да отпаци дођу на било који начин у додир

са пољопривредним земљиштем или изворима воде која може бити коришћена за наводњавање пољопривредног земљишта.

Члан 13.

Машине, превозна средства, складишта и њихови делови и други објекти и предмети, укључујући и материјал за паковање, који су означени као заражени или се сматрају зараженима морају да се очисте и дезинфикују применом одговарајућих метода за чишћење и дезинфекцију којима се отклања опасност од ширења штетног организма.

У случају када материјал за паковање из става 1. овог члана није могуће очистити и дезинфиковати тако да се отклони опасност од ширења штетног организма налаже се његово уништавање.

Члан 14.

На пољу које је означено као заражено спроводе се следеће мере:

1) за време од најмање три вегетационе године после године у којој је утврђена зараза забрањена је садња кртола и биљака као и сетва семена кромпира у ботаничком смислу и других биљака домаћина штетног организма или усева за које је утврђено да омогућују ширење штетног организма и уклањање самониклих биљака кромпира и других биљака домаћина штетног организма. У првој сезони производње кромпира која следи после периода из става 1. овог члана, под условом да на пољу најмање две последње вегетационе године током спровођења прегледа нису пронађене самоникле биљке кромпира и друге биљке домаћини, дозвољава се производња искључиво меркантилног кромпира и спроводи лабораторијско испитивање кртола приликом вађења. У сезони производње кромпира која следи после сезоне из става 2. овог члана, дозволиће се, уз одговарајући плодоред, који мора бити најмање двогодишњи за производњу семенског кромпира, производња семенског или меркантилног кромпира, уз спровођење прегледа;

2) током четири вегетационе године после године у којој је утврђена зараза спроводе се мере одржавања поља на угару или коришћење поља као трајног пашњака са интензивном испашом или честом ниском косидбом и уклањање самониклих биљака кромпира и других самониклих биљака домаћина штетног организма.

После спровођења мера из става 1. тачка 2) овог члана, у следећој вегетационој години дозволиће се производња семенског или меркантилног кромпира, уз лабораторијско испитивање извађених кртола ако на пољу које је означено као заражено у току спровођења прегледа нису пронађене самоникле биљке кромпира и друге биљке домаћини најмање две узастопне вегетационе године.

Члан 15.

На осталим пољима унутар места производње које је означено као заражено у вегетационој години која следи после године у којој је утврђена зараза забрањује се садња кртола и биљака кромпира, као и сетва семена кромпира у ботаничком смислу и налаже уклањање самониклих биљака домаћина штетног организма.

Изузетно од става 1. овог члана, ако је пре садње утврђено да је отклоњена опасност од самониклих биљака кромпира, може се дозволити садња сертификованог семенског кромпира намењеног искључиво производњи меркантилног кромпира уз обавезно лабораторијско испитивање извађених кртола.

У другој и трећој вегетационој години које следе после године у којој је зараза утврђена, после спровођења мера из ст. 1. и 2. овог члана дозволиће се садња искључиво сертификованог семенског кромпира за семенску или меркантилну производњу

Поред мера из ст. 1, 2. и 3. овог члана најмање три вегетационе године спроводи се уклањање самониклих биљака кромпира и других биљака домаћина штетног организма ако су присутне, као и лабораторијско испитивање извађеног кромпира са сваког поља.

Члан 16.

У заштићеним просторима на месту производње које је означено као заражено који су намењени производњи биља није дозвољена садња кртола и биљака кромпира као и сетва

семена кромпира у ботаничком смислу, све док се не спроведу мере уништавања штетног организма и не уклоне остаци биљака домаћина, при чему се као минимална мера спроводи замена супстрата за гајење, чишћење и дезинфекција производне јединице и целокупне опреме.

После спровођења мера из става 1. овог члана дозволиће се садња искључиво сертификованог семенског кромпира или мини-кртола или микро биљака добијених из културе биљног ткива које потичу из тестираних извора.

Члан 17.

Ради праћења здравственог стања биља, биљних производа и прописаних објеката у зараженом или угроженом подручју и утврђивања услова за престанак наложених мера, поред спровођења мера из чл. 10. до 16. овог правилника, у току најмање три вегетационе године које следе после године у којој је зараза утврђена:

1) врши се надзор места на којима се производе, складиште, налазе или дорађују кртоле кромпира, укључујући и парцеле, површине, уређаје и опрему;

2) врши се садња унутар зараженог или угроженог подручја, искључиво сертификованог семенског кромпира и обавезно испитивање после вађења семенског кромпира који је произведен на могуће зараженим местима производње;

3) на свим производним површинама унутар зараженог и угроженог подручја са произведеним семенским кромпиром поступа се одвојено од меркантилног кромпира или се врши чишћење и дезинфекција објеката, уређаја и опреме између поступања са семенским и меркантилним кромпиром.

IV. НАЧИН ОБАВЕШТАВАЊА О ПРЕДУЗЕТИМ МЕРАМА И ПРЕСТАНАК МЕРА

Члан 18.

Подаци и информације о потврђеној зарази, као и подаци и информације о престанку мера достављају се међународним организацијама и другим државама у складу са међународном конвенцијом и споразумима обавезујућим за Републику Србију.

Министарство ће доставити службеном телу надлежном за заштиту биља државе у којој постоји опасност од ширења заразе следеће податке:

1) назив сорте кромпира и партије;

2) намену (меркантилни или семенски), и када је могуће, категорију семенског кромпира;

3) назив и адресу пошиљаоца и примаоца;

4) датум доспећа партије кромпира;

5) величину испоручене партије кромпира;

б) копију фитоцертификата.

V. ЗАВРШНА ОДРЕДБА

Члан 19.

Овај правилник ступа на снагу осмог дана од дана објављивања у „Службеном гласнику Републике Србије”.

Број 110-00-285/2009-09

У Београду, 3. децембра 2009. године

Министар,

др Саша Драгин, с.р.

ПРИЛОГ

ШЕМА ТЕСТИРАЊА

ЗА ДИЈАГНОСТИКУ, ДЕТЕКЦИЈУ И ИДЕНТИФИКАЦИЈУ ПРОУЗРОКОВАЧА ПРСТЕНАСТЕ ТРУЛЕЖИ КРОМПИРА

Поглавље I

ОБЛАСТ ПРИМЕНЕ ШЕМЕ ТЕСТИРАЊА

Приказана шема тестирања описује различите поступке укључене у:

- 1) дијагнозу прстенасте трулежи на кртолама и биљкама кромпира;
- 2) детекцију *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* у узорцима кртола кромпира и биљкама;
- 3) идентификацију *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*C. m.* subsp. *sepedonicus*).

Поглавље II

I. ОПШТА НАЧЕЛА

У поглављима III–XI овог прилога се налазе стандардни протоколи за поједине методе, потврђени и одобрени реагенси и појединости везане за припрему материјала за тестирање и референтног материјала. У Поглављу III овог прилога се налази и списак лабораторија укључених у процес оптимизације и валидације протокола.

С обзиром да протоколи укључују методе детекције карантинског организма, што подразумева и употребу живих референтних култура *C.m.* subsp. *sepedonicus*, процедура се мора изводити у

прописаним карантинским условима са одговарајућим објектима за одлагање, чување и уништавање отпада у складу са Правилником.

Параметри тестирања морају обезбедити уједначене и поновљиве нивое детекције *S.m. subsp. sepedonicus* према прописаним праговима осетљивости појединих метода.

Обавезна је прецизна припрема позитивних контрола.

Тестирање у складу са захтеваним прагом осетљивости подразумева правилно постављање, одржавање и калибрирање опреме, пажљиво руковање и чување реагенаса као и предузимање мера за спречавање контаминације између узорака, нпр. раздвајање позитивних контрола од узорака за тестирање. Како би се избегле административне или друге грешке, морају се примењивати стандарди контроле квалитета, посебно при означавању узорака и вођењу документације.

Сумња на присуство патогена у узорку подразумева позитиван резултат теста провере узорка, као што је приказано у дијаграмима тока.

Ако је резултат првог теста провере (IF или PCR/FISH) позитиван, тада се сумња на присуство *S.m. subsp. sepedonicus* и потребно је применити и други тест провере. Ако је резултат и другог теста позитиван, тада је сумња потврђена и тестирање се наставља према описаној шеми. Ако је резултат другог теста негативан, тада се сматра да *S.m. subsp. sepedonicus* није присутна у узорку.

Позитиван резултат IF теста се дефинише као позитивно читавање IF теста потврђено и другим тестом провере (PCR/FISH).

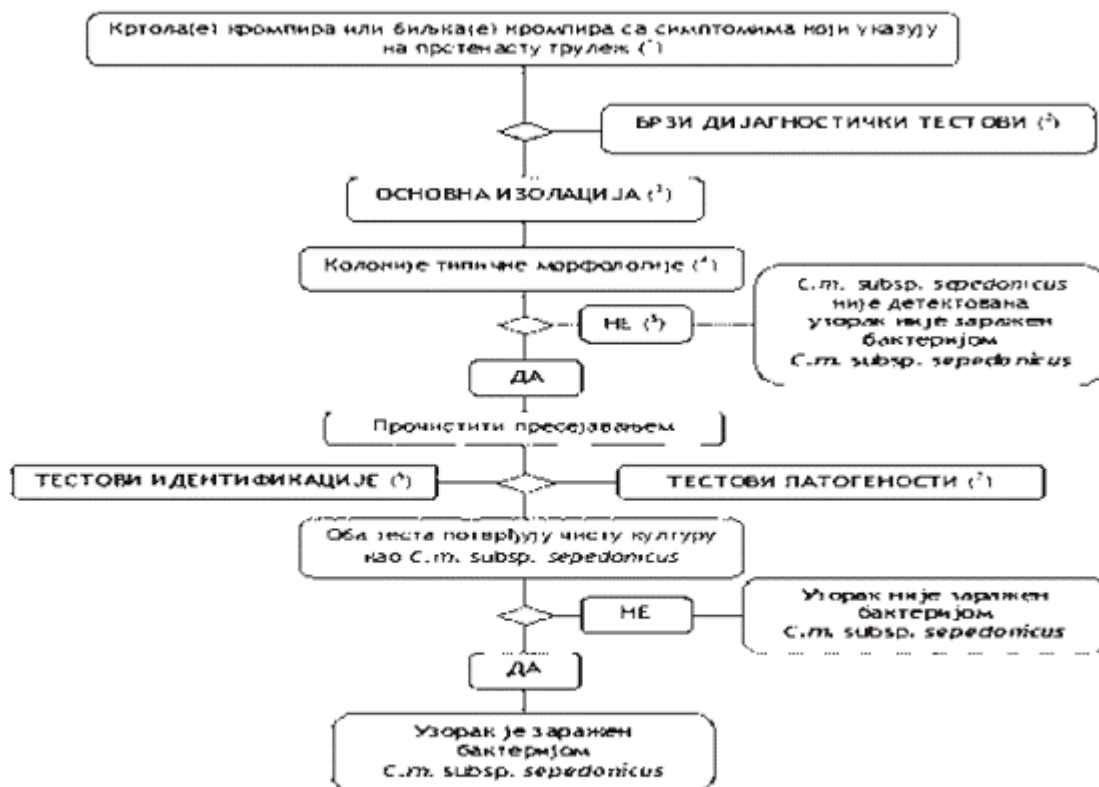
Потврђено присуство патогена подразумева изолацију и идентификацију чисте културе *Ц.м. ссп. сепедоницус* и потврду патогености.

1. Приказ дијаграма тока

1.1. Шема утврђивања присуства проузроковача прстенасте трулежи у кртолама и биљкама кромпира са типичним симптомима прстенасте трулежи

(Шема 1)

Поступак тестирања се примењује за кртоле и биљке кромпира са типичним симптомима или симптомима који изазивају сумњу на присуство проузроковача прстенасте трулежи. Поступак укључује тест провере, изолацију патогена из зараженог спроводног ткива на хранљиву подлогу и, у случају позитивног резултата, идентификацију чисте културе *S.m. subsp. sepedonicus*.



Шема 1.

1) опис симптома наведен је у тачки 2. овог поглавља;

2) одговарајући тестови су:

- IF тест (тачка 4. овог поглавља);
- PCR тест (тачка 6. овог поглавља);
- FISH тест (тачка 5. овог поглавља);

3) иако је изолација патогена из биљног материјала са типичним симптомима применом методе разређења и засејавања на хранљиву подлогу једноставна, овај поступак може бити значајно отежан у узорцима у поодмаклој фази инфекције. Сапрофитне бактерије које се развијају на оболелом ткиву могу прерасти или инхибирати патогена на хранљивој подлози. Зато се препоручује коришћење и неселективне и селективне хранљиве подлоге (најбоље MTNA или примена биолошког теста из тачке 7. овог поглавља);

4) опис типичне морфологије колоније наведен је у тачки 8. овог поглавља;

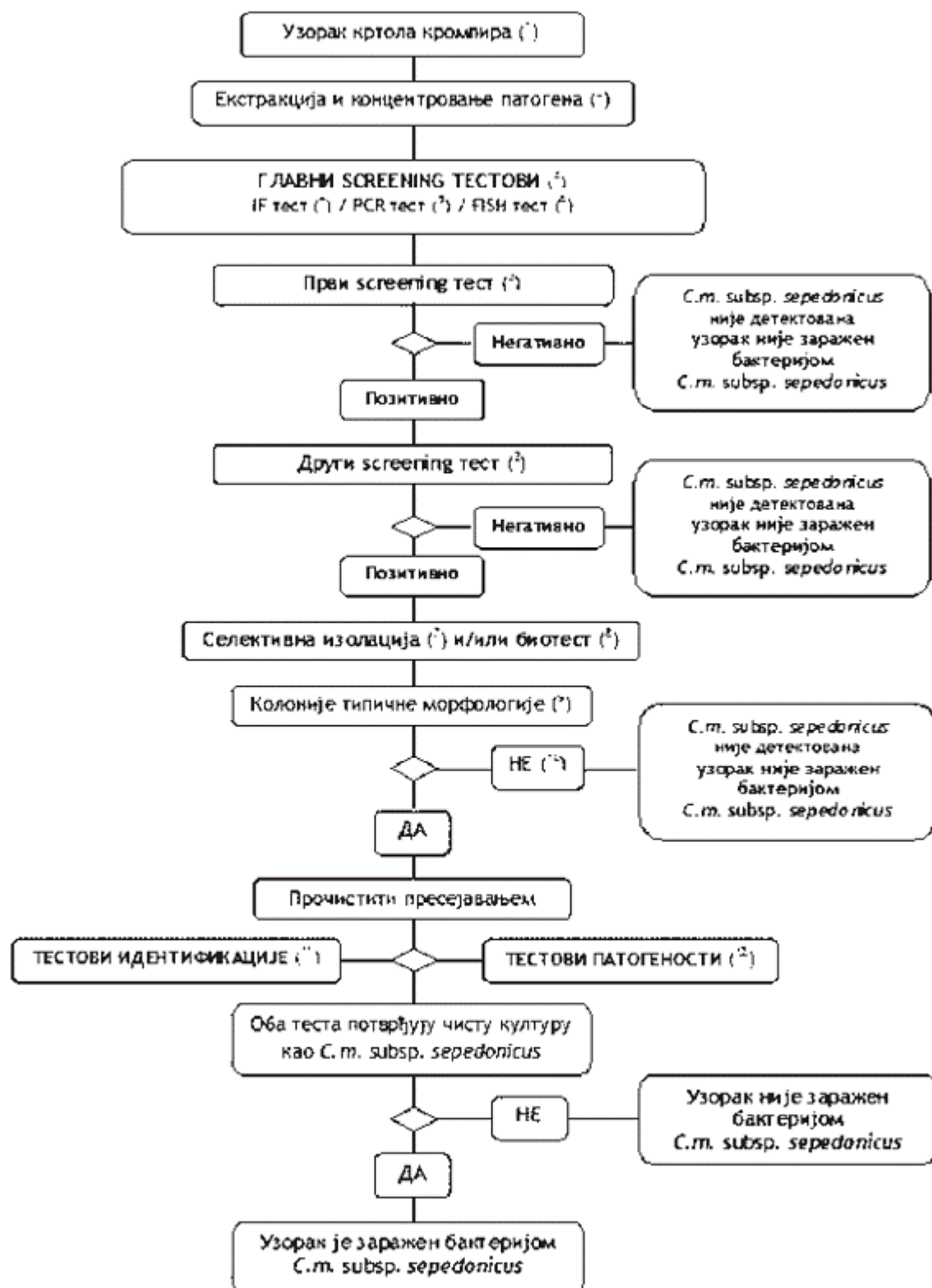
5) ако је резултат изолације негативан, али су симптоми болести типични, тада је потребно поновити поступак изолације патогена;

6) поуздана идентификација чисте културе *C.m. subsp. sepedonicus* постиже се применом тестова наведених у тачки 9. овог поглавља;

7) тест патогености описан је у тачки 10. овог поглавља.

1.2. Шема за утврђивање присуства и идентификацију *C.m. subsp. sepedonicus* у узорцима кртола кромпира без видљивих симптома

(Шема 2)



Шема 2.

- 1) стандардна величина узорка је 200 кртола – ако на располагању нема 200 кртола, поступак се може спровести и на мањим узорцима;
- 2) методе екстракције и концентровања патогена описане су у тачки 3. овог поглавља;
- 3) ако су резултати најмање два теста, који се темеље на различитим биолошким начелима, позитивни, потребно је извршити изолацију и потврдити присуство патогена. Извршити бар један тест провере. Када је резултат теста негативан, сматра се да је узорак негативан. У случају да је резултат тог теста позитиван, потребно је извршити други или више тестова провере, који се темеље на различитим биолошким начелима, како би се потврдио позитиван резултат. Ако су резултати осталих тестова негативни, сматра се да је тај узорак негативан. Даље тестирање није потребно;
- 4) тест имунофлуоресценције (IF): Користити поликлонална антитела за IF тест, а додатна моноклонална антитела омогућавају већу специфичност (тачка 4. овог поглавља);
- 5) PCR тест. Користити потврђене и одобрене реагенсе и протоколе за PCR (тачка 6. овог поглавља);
- 6) FISH тест: Користити потврђене реагенсе и протоколе (тачка 5. овог поглавља);
- 7) селективна изолација: У многим случајевима, коришћење MTNA или NCP-88 хранљивих подлога и 1/100 разређења ресуспендованог талогa је одговарајућа метода за директну изолацију *C.m. subsp. sepedonicus*. Типичне колоније се појављују три до десет дана после засејавања на хранљиву подлогу, када их је могуће пречистити и идентификовати патогена. Пажљивим вађењем и припремом конуса пупчаног дела кртоле кромпира избегава се појава сапрофитних бактерија са кртола кромпира, које на хранљивој подлози конкуришу колонији *C.m. subsp. sepedonicus* и могу је прерасти. Ако се патоген не може изоловати на хранљивој подлози, потребно је поновити поступак изолације коришћењем биљака из биолошког теста (тачка 8. овог поглавља);
- 8) биолошки тест се користи за изолацију *C.m. subsp. sepedonicus* из екстракта селективним обогаћивањем у биљкама плавог патлицана (Соланум мелонгена). Тест захтева оптималне услове инкубације, као што је наведено у овој методи. Током примене овог теста, највероватније је да неће доћи до појаве бактерија које инхибирају раст и развој *C.m. subsp. sepedonicus* на хранљивим подлогама MTNA или NCP-88 (тачка 7. овог поглавља);
- 9) типична морфологија колоније описана је у тачки 8. овог поглавља;
- 10) гајење бактеријске културе или биолошки тест могу бити неуспешни због конкуренције или инхибиције сапрофитним бактеријама. Ако се у тестовима провере добију јасно позитивни резултати, а резултати изолације су негативни, поновити тестове изолације из истог ресуспендованог талогa или поновити узимање спроводног ткива на месту везивања столона код кртола из истог узорка и, ако је потребно, тестирати додатне узорке;

11) поуздана идентификација чистих култура *C.m. subsp. sepedonicus* постиже се извођењем тестова описаних у тачки 9. овог поглавља;

12) тест патогености описан је у тачки 10. овог поглавља.

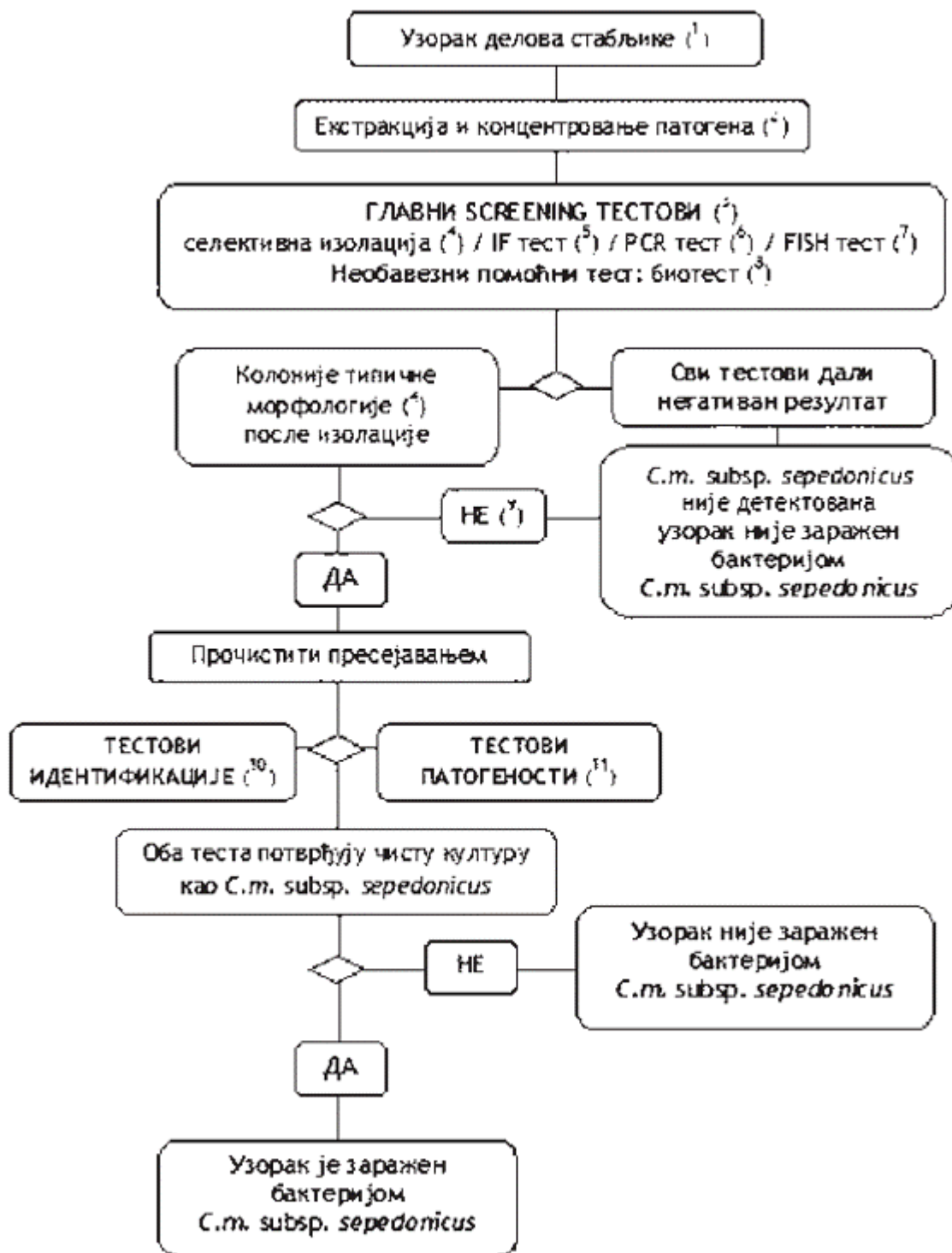
Начело – Поступак тестирања намењен је за откривање присуства скривене заразе у кртолама кромпира.

Позитиван резултат најмање два теста провере, темељи се на различитим биолошким начелима, допуњује се изолацијом патогена, после чега, у случају изолације типичних колонија, следи потврда чисте културе *C.m. subsp. sepedonicus*. Позитиван резултат само једног од тестова провере није довољан да би се узорак сматрао вероватно зараженим.

Тестови провере и изолација морају омогућити ниво осетљивости детекције 10^3 до 10^4 ћелија/ml ресуспендованог талоба, укљученог као позитивна контрола у свакој серији тестова.

1.3. Шема за утврђивање присуства и идентификацију *C. m. ssp. sepedonicus* у узорцима биљака кромпира без симптома

(Шема 3)



Шема 3.

- 1) препоручене величине узорака наведене су у тачки 3. подтачка 3.2. овог поглавља;
- 2) екстракција патогена и методе концентровања описане су у тачки 3. подтачка 3.2. овог поглавља;

3) ако су резултати најмање два теста, који се темеље на различитим биолошким начелима, позитивни, потребно је извршити изолацију и потврду присуства патогена. Извршити бар један тест провере. Када је резултат теста негативан, сматра се да је узорак негативан. У случају да је резултат тог теста позитиван, потребно је извршити други или више тестова провере, који се темеље на различитим биолошким начелима, како би се потврдио позитиван резултат. Ако су резултати осталих тестова негативни, сматра се да је тај узорак негативан. Даље тестирање није потребно;

4) селективна изолација и типична морфологија колоније описани су у тачки 8. овог поглавља;

5) IF тест описан је у тачки 4. овог поглавља;

6) PCR тестови описани су у тачки 6. овог поглавља;

7) FISH тест описан је у тачки 5. овог поглавља;

8) биолошки тест описан је у тачки 7. овог поглавља;

9) гајење бактеријске културе или биолошки тест могу бити неуспешни због конкуренције или инхибиције сапрофитним бактеријама. Ако се у тестовима провере добију јасно позитивни резултати, а резултати изолације су негативни, поновити тестове изолације из истог ресуспендованог талога или поновити узимање спроводног ткива на месту везивања столона код кртола из истог узорка и, ако је потребно, тестирати додатне узорке;

10) поуздана идентификација чистих култура *C.m. subsp. sepedonicus* постиже се извођењем тестова описаних у тачки 9. овог поглавља;

11) тест патогености описан је у тачки 10. овог поглавља.

2. Визуелни преглед за откривање симптома прстенасте трулежи

2.1. Биљке кромпира

У европским климатским условима симптоми се ретко проналазе у пољу и то често тек на крају сезоне. Осим тога, симптоми су често прикривени или се могу заменити са симптомима других биљних болести, старења биљака или механичким оштећењима. Зато се симптоми могу врло лако превидети приликом прегледа у пољу. Симптоми увенућа се разликују од оних код проузроковача мрке трулежи; увенуће је обично споро и у почетку ограничено на ивице листова. Млади заражени листови често настављају раст, мада у зараженим деловима спорије, што доводи до формирања листова необичног облика. Због блокаде спроводног ткива у доњем делу стабљике, на листовима се, између лисних нерава често појављују хлоротичне, жуто-наранџасте површине. Временом пропадају заражени делови листа, листови, па чак и стабљике. Често долази само до смањења величине листова и кртола. Повремено су биљке закржљале.

Фотографије различитих симптома могу се пронаћи на веб страници:

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

2.2. Кртоле кромпира

У најранијој фази појаве симптома, ткиво кртоле је стакласто или прозирно, без омекшавања око спроводног ткива, посебно у близини пупчаног дела кртоле. У пупчаном делу кртоле, прстен спроводног система може бити мало тамнији од уобичајеног. Први лако уочљив симптом је жућкаста боја спроводног прстена, а када се кртола благо стисне, из спроводних судова излазе мале количине материје сирасте конзистенције, која садржи милионе бактерија.

Могућ је развој појаве браон (смеђе, мрке) боје спроводног ткива и симптоми на кртоли су у овом стадијуму слични симптомима мрке трулежи коју проузрокује Ралстониа соланацеарум. У почетку, симптоми су ограничени на један део спроводног прстена, не обавезно близу пупка, а касније се постепено проширују на цео прстен. Како инфекција напредује, долази до потпуног пропадања спроводног ткива; спољни и унутрашњи део кртоле се могу раздвојити. У каснијим фазама инфекције, на површини кртола појављују се пукотине, које су често црвенкасто-смеђе по ивицама. Недавно је у Европи забележено неколико случајева појаве симптома где је средиште кртоле трнуло истовремено са спроводним прстеном што је довело до секундарног напада патогена са стварањем унутрашњих шупљина и некроза. Присуство секундарних гљива или бактерија може прикрити симптоме, услед чега може бити тешко, чак и немогуће, разликовати унапредовале симптоме прстенасте трулежи од других трулежи кртола. Могућа је појава и нетипичних симптома прстенасте трулежи. Фотографије различитих симптома могу се пронаћи на веб страници <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

3. Припрема узорка

3.1. Кртоле кромпира

Напомена:

– стандардна величина узорка је 200 кртола по тесту. Интензивније узорковање захтева извођење већег броја тестова на узорцима те величине. Већи број кртола у узорку довешће до инхибиције или ће отежати тумачење резултата. Поступак се може применити и за узорке са мање од 200 кртола, када је на располагању мање кртола;

– валидација свих метода за утврђивање присуства патогена, које су описане у даљем тексту, базира се на тестирању узорка од 200 кртола;

– екстракт кромпира који је описан у даљем тексту може се користити и за утврђивање присуства проузроковача мрке трулежи кромпира, бактерије Ралстониа соланацеарум.

Процедура која претходи припреми узорка: опрати кртоле, употребити одговарајућа дезинфекциона средства (при коришћењу PCR теста употребити једињења хлора ради уклањања евентуално присутне ДНК патогена) и детерценте између сваког узорка, осушити кртоле на ваздуху.

Поступак прања је посебно користан али не и обавезан за случајеве обраде узорка са већом количином земље, при извођењу PCR теста или процедуре директне изолације.

3.1.1. Чистим и дезинфикованим скалпелом или ножем за поврће уклонити покожицу са пупчаног дела кртоле тако да се виде спроводни судови. Пажљиво изрезати мали конусни део спроводног ткива на пупчаном делу захватајући што мање околног, неспроводног ткива (видети веб страну: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Напомена:

Све кртоле са потенцијално сумњивим симптомима прстенасте трулежи одвојити посебно и тестирати.

Ако се приликом вађења конуса из пупчаног дела уоче потенцијални симптоми прстенасте трулежи, кртоле треба визуелно прегледати. Сваку пресечену кртолу са оваквим симптомима треба оставити два дана на собној температури, а потом чувати у карантинским условима (на 4 до 10 °C) до спровођења тестирања. Све кртоле у узорку (укључујући и оне са сумњивим симптомима) треба чувати на начин прописан овим правилником.

3.1.2. Извађене конусе из пупчаног дела кртоле који садрже делове спроводног ткива ставити у стерилне посуде које се могу запечатити и/или херметички затворити (ако су посуде већ употребљаване, морају се темељно очистити и дезинфиковати употребом средстава на бази једињења хлора). Узорке је пожељно одмах обрадити. Ако то није могуће, потребно је чувати их у посуди без додатка пуфера, најдуже 72 сата у фрижидеру или најдуже 24 сата на собној температури. Током чувања долази до сушења и суберизације сржног дела конуса, као и до раста и развоја сапрофита, што може ометати утврђивање присуства бактерије проузроковача прстенасте трулежи.

3.1.3. Извађене конусе из пупчаног дела кртоле обрадити коришћењем једног од следећих поступака:

а) извађене конусе прекрити довољном количином (око 40 ml) екстракционог пуфера (Поглавље V овог прилога) и ултрацентрифугирати на 50 до 100 обртаја/мин, четири сата на температури испод 24 °C или 16 до 24 сата уз хлађење;

б) извађене конусе хомогенизовати са довољном количином (око 40 ml) екстракционог пуфера (Поглавље V овог прилога), било у мешалици (нпр. Waring или Ultra Thorough) било дробљењем у затвореној кеси за мацерацију за једнократну употребу (нпр. кесе Stomacher или Биореба од чврстог политена, 150 mm x 250 mm, стерилизоване зрачењем) користећи гумени чекић или одговарајући апарат за мацерирање (нпр. Хомех).

Напомена:

Ако се узорци хомогенизују у блендеру, постоји велика опасност од њихове унакрсне контаминације. Предузети мере опреза у циљу спречавања настајања аеросола или просипања током екстракције. За сваки узорак употребити стерилизоване ножиће и посуде. Током процедуре PCR-а, спречити пренос ДНК на контејнере или апаратуру за мацерирање. За PCR тест препоручује се мацерирање узорака у кесицама за једнократну употребу и даље коришћење епрувета и туба за једнократну употребу.

3.1.4. Одлити супернатант. Ако је превише мутан, разбистрити га ултрацентрифугирањем на мањем броју обртаја (највише 180 г/ 10 минута на температури од 4 до 10°C) или вакуумском филтрацијом (40 до 100 µm) током које се филтер додатно испира екстракционим пуфером (око 10 ml) (Поглавље Новог прилога).

3.1.5. Извршити концентрисање фракције бактерије центрифугирањем на 7000 g 15 минута (или 10.000 g 10 минута) на температури од 4 до 10°C, после чега се пажљиво, без мешања са талогом одлива супернатант.

3.1.6. Ресуспендовати талог у 1,5 ml пелет пуфера (пуфера за растварање талого) (Поглавље V овог прилога). Од ове количине користити 500 µl за тестирање на присуство *C.m. subsp. sepedonicus*, 500 µl за тестирање на присуство *Ralstonia solanacearum* и 500 µl као референтни материјал за чување. У последњи, референтни део од 500 µl додати стерилни глицерол у коначној концентрацији од 10 до 25% (v/v), промешати и чувати на температури од -16 до -24 °C (недељама) или на -68 до -86 °C (месецима). Делове одвојене за утврђивање присуства бактерија, током тестирања чувати на температури од 4 до 10 °C. Не препоручује се вишеструко замрзавање и одмрзавање. У случају потребе за транспортом узорака, исти доставити у преносивом фрижидеру у року од 24 до 48 сати.

3.1.7. Важно је да се све позитивне контроле *C.m. subsp. sepedonicus* узорци држе одвојено да би се избегла контаминација. Ово се односи и на IF плочице и друге тестове.

3.2. Биљке кромпира

Напомена:

За откривање латентних популација *C.m. subsp. sepedonicus* препоручује се тестирање збирних узорака. Поступак се може погодније применити на збирне узорке са највише 200 делова стабљике (узимање узорака током спровођења надзора се мора темељити на статистички репрезентативном узорку испитиване биљне популације).

3.2.1. Чистим дезинфикованим ножем или маказама за резидбу одрезати 1 до 2 cm доњег дела сваке стабљике, одмах изнад површине земљишта. Делове стабљике дезинфиковати кратким потапањем у 70% етанол и одмах осушити упијајућим папиром. Ставити делове стабљике у затворену стерилну посуду.

3.2.2. Обрадити делове стабљике помоћу једног од следећих поступака:

а) делове стабљике прекрити довољном количином (приближно 40 ml) екстракционог пуфера (Поглавље V овог прилога) и ултрацентрифугирати на 50 до 100 обртаја/мин четири сата на температури испод 24 °C или 16 до 24 сата уз хлађење;

б) делове стабљике измацерирати у чврстој кеси за мацерацију (нпр. Стомацхер или Биореба) са одговарајућом количином екстракционог пуфера (Поглавље V овог прилога) користећи гумени чекић или одговарајућу опрему за мацерирање (нпр. Хомех). Ако то није могуће, делове стабљике чувати у фрижидеру најдуже 72 сата или на собној температури најдуже 24 сата.

3.2.3. Након 15 минута таложења, одлити супернатант.

3.2.4. Даље избистравање екстракта или концентровање фракције бактерија обично није потребно, али се може постићи филтрирањем и/или центрифугирањем.

3.2.5. Поделити чисти или концентровани екстракт узорка на два једнака дела. Једну половину чувати на температури од 4 до 10 °C током тестирања, а другу половину оставити за случај употребе у додатним тестирањима: у екстракт се додаје 10–25% (v/v) стерилног глицерола и чува на температури од –16 до –24°C (недељама) или на –68 до –86 °C (месецима).

4. IF тест

Начело– Употреба IF теста као главног теста провере препоручује се због његове доказане уједначености у постизању захтеваних прагова осетљивости методе.

Када се IF тест користи као главни тест провере и ако је IF читавање позитивно, додатно се као други тест користи PCR или FISH тест. Када се IF тест користи као други тест провере и IF читавање је позитивно, даља тестирања у циљу комплетирања анализа се изводе према дијаграму тока.

Напомена:

Када се IF тест користи као главни тест провере, увек користити поликлонална антитела. У случају позитивног IF читавања с поликлоналним антителима, даља провера употребом моноклоналних антитела може повећати специфичност, али и умањити осетљивост теста.

Употребити антитела за референтни сој *C.m. subsp. sepedonicus*. Препоручује се одређивање титра за сваку нову серију антитела. Титар се дефинише као највеће разређење у коме долази до оптималне реакције при тестирању суспензије која садржи 10⁵ до 10⁶ ћелија по ml одговарајућег соја *C.m. subsp. sepedonicus* уз коришћење флуоресцеин-изотиоцијанат (FITC) коњугата у складу с препорукама произвођача. Неразређена поликлонална и моноклонална антитела треба да имају IF титар најмање 1:2000. Током тестирања користити радна разређења антитела, која су близу или једнака титру. Користити потврђена и одобрена антитела (видети веб страницу: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Тестирање треба извршити на свеже припремљеним екстрактима узорака, а по потреби, тестирање се може успешно извршити и на екстрактима који су били чувани на температури од –68 до –86 °C са додатком глицерола. Глицерол уклонити додавањем 1 ml пелет пуфера (пуфера за растварање талога), поновним центрифугирањем на 7000 g у трајању од 15 минута и ресуспендовањем талога у једнакој запремини пелет пуфера. Овај део процедуре често није потребан, нарочито ако су узорци фиксирани на микроскопска IF стакла пламеном.

На одвојеним микроскопским стаклима припремити позитивну контролу и то хомологни или неки други референтни изолат *C.m. subsp. sepedonicus*, растворен у екстракту кромпира и по избору у пуферу.

На истој IF плочици треба, где год је то могуће, користити и позитивну контролу коју чини природно заражено ткиво (лиофилизовано или замрзнуто на –16 до –24 °C).

Негативну контролу могу представљати и делови екстракта узорка који су у ранијем тестирању показали негативан резултат.

Користити микроскопске плочице са више бунарчића, по могућности са 10 отвора пречника најмање 6 mm.

Применити идентичан поступак тестирања на узорке и на позитивне и негативне контроле.

4.1. Припремити IF плочице за тестирање једним од следећих поступака:

а) за талог са релативно малом количином наталоженог скроба: у први бунарчић пипетом одмерити стандардну запремину разређења од 1/100 ресуспендованог талог кромпира (15 µl је довољно за бунарчиће пречника 6 mm – повећати запремину за веће бунарчиће). Потом у остале бунарчиће у истом реду пипетом одмерити сличну запремину неразређене суспензије (1/1) талог. Други ред се може користити као дупликат првог или за други узорак како је приказано на Шеми 4;

б) за остале суспензије талог: припремити децимална разређења (1/10 и 1/100) ресуспендованог талог у пуферу за талог. У један ред бунарчића пипетом одмерити стандардну запремину ресуспендованог талог и сваког разређења (15 µl је довољно за бунарчиће пречника 6 mm – повећати запремину за веће). Други ред се може користити као дупликат првог или за други узорак као што је приказано на Шеми 5.

4.2. Оставити да се капљице осуше на собној температури или их загревати до температуре од 40 до 45 °C. Ћелије бактерија фиксирати на IF плочицу загревањем (15 минута на 60 °C), провлачењем кроз пламен, 95%-тним етанолом или према посебним упутствима произвођача антитела.

Уколико је то неопходно, фиксирани плочице се могу чувати замрзнуте у десикатору у краћем временском интервалу (највише до три месеца).



Шема 4.

4.3. IF поступак:

а) У складу са поступком за припрему плочица за тестирање како је описано у 4.1 а): припремити двоструки низ разређења антитела у IF пуферу. Први бунарчић мора имати 1/2 титра (Т/2), а остали 1/4 титра (Т/4), 1/2 титра (Т/2), титар (Т) и двоструки титар (2Т);

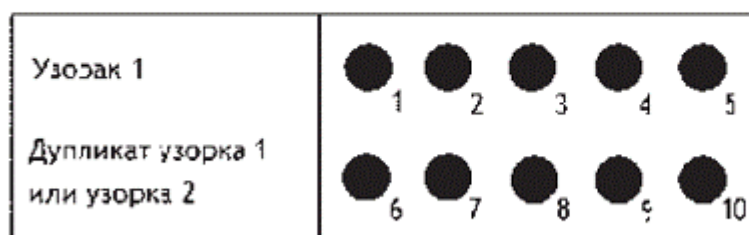
б) у складу с поступком за припрему плочица за тестирање како је описано у 4.1 б):

Припремити радно разређење антитела у IF пуферу. Радно разређење утиче на специфичност.

Припрема плочица у складу са тачкама 4.1 (б) и 4.3(б)

Радна разређења серума/антитела

1/1 1/10 1/100 празно празно □ децимална разређења ресусгендованог талоза



Шема 5.

4.3.1. Поређати плочице на навлажени папир. Сваки бунарчић потпуно испунити разређењем антитела. Запремина антитела мора бити једнака запремини нанесеног екстракта.

Уколико не постоје посебна упутства произвођача антитела, потребно је следити следећу процедуру:

4.3.2. Инкубирати прекривене плочице на влажном папиру 30 минута на собној температури (18 до 25 °C).

4.3.3. Капљице са сваке плочице отрести и плочице пажљиво испрати IF пуфером. Потопити плочице у IF пуфер-Tween (Поглавље V овог прилога) па у IF пуфер, у трајању од по пет минута. Спречити стварање аеросола или пренос капљица јер би могло доћи до унакрсне контаминације узорка. Плочице пажљиво осушити упијајућим папиром.

4.3.4. Поређати плочице на навлажени упијајући папир. Бунарчиће попунити разређеним FITC коњугатом који се користи за одређивање титра. Запремина коњугата нанесеног на бунарчић мора бити једнака запремини нанесеног антитела.

4.3.5. Инкубирати покривене плочице на влажном папиру, 30 минута на собној температури (18 до 25 °C).

4.3.6. Отрести капљице коњугата са плочица. Испрати и опрати плочице како је претходно описано (4.3.3). Плочице пажљиво осушити.

4.3.7. На сваки бунарчић пипетом нанети 5–10 μ l 0,1 M глицерола са фосфатним пуфером (Поглавље V овог прилога) или комерцијално доступно средство против изблеђивања и ставити покривно стакло.

4.4. Очитавање IF теста:

4.4.1. Прегледати припремљене плочице под епифлуоресцентним микроскопом са одговарајућим филтерима за ексцитацију FITC-а, под уљном или воденом имерзијом и увећањем од 500-1000 x. Прегледати сваки бунарчић уздуж и попречно, под правим углом и дуж спољне ивице. За узорке у којима је видљив мали број ћелија или их уопште нема прегледати најмање 40 микроскопских видних поља.

Прво треба прегледати плочицу с позитивном контролом. Ћелије морају бити изразито флуоресцентне и потпуно обојене на утврђеном титру антитела или радног разређења. У случају да код обојености дође до одступања, IF тест се мора поновити.

4.4.2. Утврдити да ли јасно флуоресцентне ћелије које се уочавају у бунарчићима имају морфологију карактеристичну за *C.m. subsp. sepedonicus* (видети веб страницу: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Интензитет флуоресценције мора бити једнак или бољи од оног који даје позитивни контролни изолат, при једнаком разређењу антитела. Занемарити непотпуно обојене или слабо флуоресцентне ћелије.

Уколико се посумња на контаминацију, тест се мора поновити (нпр. ако због контаминације пуфера све плочице у серији показују позитивне ћелије или ако су позитивне ћелије пронађене (изван бунарчића) на површини плочице).

4.4.3. Постоји неколико проблема у вези са специфичношћу теста имунофлуоресценције. У концентрованом екстракту издвојених конуса пупчаних делова кртоле или делова стабљике увек се очекује и присуство популација флуоресцентних ћелија са нетипичном морфологијом или унакрсна реакција са сапрофитним бактеријама сличне величине и грађе као *C.m. subsp. sepedonicus*.

4.4.4. Приликом очитавања у обзир се узимају само флуоресцентне ћелије типичне величине и морфологије у титру или радном разређењу антитела како је описано у тачки 4. подтачка 4.3. овог поглавља.

4.4.5. Тумачење очитавања IF теста:

а) уколико се утврди присуство јасно флуоресцентних ћелија карактеристичне морфологије, одредити просечан број типичних ћелија по микроскопском видном пољу и израчунати број типичних ћелија по ml ресуспендованог талога (Поглавље VI овог прилога).

Очитавање IF теста је позитивно за узорке који имају најмање 5×10^3 типичних ћелија по ml ресуспендованог талога. Овакав узорак се сматра потенцијално контаминираним и потребно је извршити даље тестирање;

б) очитавање IF теста је негативно за узорке који имају мање од 5×10^3 ћелија по ml ресуспендованог талога и узорак се сматра негативним. Није потребно даље тестирање.

5. FISH тест

Начело – уколико се у FISH тесту као првом тесту провере добије позитиван резултат, IF тест се користи као други обавезни тест провере. Ако се FISH тест користи као други тест провере и ако се њиме добије позитиван резултат, за постављање коначне дијагнозе треба обавити даље тестирање према дијаграму тока.

Напомена:

Користити потврђене и одобрене олиго-пробе специфичне за бактерију *S.m. subsp. sepedonicus* (Поглавље IX овог прилога). Прелиминарна тестирања применом ове методе треба да омогуће поновљиву детекцију најмање 10^3 до 10^4 ћелија *S.m. subsp. sepedonicus* по ml додатих екстракту узорка претходно доказаног као негативног.

Поступак треба извршити на свеже припремљеним екстрактима узорака, али се успешно може применити и на екстракт узорка који је био чуван са глицеролом на температури од -16 до -24 °C или од -68 до -86 °C.

За негативну контролу употребити делове екстракта узорака који су у ранијем тестирању на *S.m. subsp. sepedonicus* доказани као негативни.

За позитивну контролу припремити суспензије које садрже 10^5 до 10^6 ћелија/ml $0,01M$ фосфатног пуфера (ПБ) *S.m. subsp. sepedonicus* (нпр. сој NCPPB 4053, или PD 406) из културе старе 3 до 5 дана (за припрему видети Поглавље IV овог прилога). Припремити одвојене плочице за позитивну контролу са хомологим или неким другим референтним изолатом *S.m. subsp. sepedonicus*, раствореним у екстракту кромпира, као што је наведено у Поглављу IV овог прилога.

Коришћење еубактеријске олиго-пробе обележене FITC-ом омогућава контролу процеса хибридизације јер ће се обојити све еубактерије присутне у узорку.

Контролни материјал тестирати применом исте процедуре као и узорке.

5.1. Фиксирање екстракта кромпира

Следећи протокол се заснива на процедури Wullings и сар., (1998):

5.1.1. Припремити раствор за фиксирање (Поглавље IX овог прилога).

5.1.2. Пипетом одмерити 100 μ l екстракта сваког узорка у Eppendorf епрувету па центрифугирати осам минута на 7000 г.

5.1.3. Уклонити супернатант и растворити талог у 500 μl фиксатива припремљеног највише 24 сата раније, промешати и инкубирати преко ноћи на 4 $^{\circ}\text{C}$. Алтернативни фиксатив је 96 % етанол. При томе је потребно растворити талог у 50 μl 0,01М ПБ и 50 μl 96% етанола, промешати и инкубирати на 4 $^{\circ}\text{C}$ 30 до 60 минута.

5.1.4. Центрифугирати осам минута на 7000 г, уклонити супернатант и ресуспендовати талог у 75 μl 0,01М ПБ (Поглавље V овог прилога).

5.1.5. У бунарчиће чистих плочица нанети 16 μl фиксираних суспензија како је приказано на Шеми 6. На сваку плочицу нанети два различита, неразређена узорка и употребити 10 μl за припремање разређења 1:100 (у 0,01М ПБ). Преостали фиксирани раствор узорка (49 μl) чувати на -20°C после додавања једнаке запремине 96%-тног етанола. Ако FISH тест треба поновити, центрифугирањем уклонити етанол и додати једнаку запремину 0,01 ПБ (уз мешање).

Приказ плочице за FISH тест



Шема 6.

5.1.6. Плочице осушити на ваздуху (или у сушници на 37 $^{\circ}\text{C}$) па их фиксирати провлачењем кроз пламен. На овом кораку се може прекинути поступак и наставити следећи дан. Плочице треба чувати на собној температури у сувом простору без прашине.

5.2. Предхибридизација и хибридизација

5.2.1. Припремити раствор лизозима који садржи 10 мг лизозима (Sigma L-6876) у 10 ml пуфера (100mM Tris-HCl, 50mM EDTA, pH 8,0). Тај се раствор може чувати, али се само једном сме замрзнути и одмрзнути. Сваки узорак добро прекрити са приближно 50 μl раствора лизозима и

инкубирати десет минута на собној температури. Затим само једном потопити плочицу у деминерализовану воду и пажљиво осушити филтер папиром.

Алтернативно, уместо лизозима додати 50 μ l 40 до 400 μ g ml⁻¹ протеиназе К у пуферу (20 mM Трис-НСl, 2mM CaCl₂, рН 7,4) на сваки бунарчић и инкубирати на 37 °C 30 минута.

5.2.2. Дехидратацију ћелија извршити узастопним потапањем плочица у 50%-тне, 80%-тне и 90%-тне етанол, у трајању од по једног минута. Плочице поставити на држач и осушити на ваздуху.

5.2.3. Припремити влажну комору за инкубацију тако што се дно херметички затворене кутије прекрива упијајућим или филтер папиром потопљеним у 1x хубмих (Поглавље IX овог прилога). Кутију претходно инкубирати у апарату за хибридизацију нуклеинских киселина на 55 °C најмање десет минута.

5.2.4. Припремити раствор за хибридизацију и то 45 μ l по плочици (Поглавље IX овог прилога) и претходно инкубирати пет минута на 55 °C.

5.2.5. Ставити плочице на термоблок на 45 °C и нанети по 10 μ l хибридизованог раствора на сваки од четири бунарчића.

5.2.6. Ставити два покривна стакалца (24 x 24 mm) на сваку плочицу пазећи при том да у бунарчићима не остане ваздух. Ставити плочицу у претходно загрејану влажну комору и хибридизовати у мраку (преко ноћи) у апарату за хибридизацију на 55 °C.

5.2.7. Припремити три посуде са 1 л Ултра чисте воде, 1Л 1x хубмих (334 ml 3x хубмих и 666 ml Ултра чисте воде) и 1Л 1/2x хубмих (167 ml 3x хубмих и 833 ml Ултра чисте воде). Сваку посуду претходно инкубирати у воденом купатилу на 55 °C.

5.2.8. Скинути покривна стакалца, а предметне плочице ставити на држач.

5.2.9. Вишак пробе уклонити инкубирањем у трајању од 15 минута на 55°C у посуди са 1x хубмих.

5.2.10. Пренети држач плочица у раствор за прање (1/2 x хубмих) и инкубирати још 15 минута.

5.2.11. Плочице накратко уронити у Ултра чисту воду и ставити на филтер папир. Вишак влаге уклонити филтер папиром. У сваки бунарчић пипетом нанети 5 до 10 μ l заштитног раствора против изблеђивања (нпр. Vectashield, VECTA Laboratories, CA, USA или еквивалентна) па целу предметну плочицу покрити великим покривним стаклом (24 x 60 mm).

5.3. Очитавање FISH теста

5.3.1. Плочице прегледати под епифлуоресцентним микроскопом, коришћењем уљане имерзије, с увећањем 630 или 1000 x. Са филтером прикладним за флуоресцеин-изотиоцијанат (FITC), еубактеријске ћелије (укључујући већину грам негативних ћелија) се у узорку виде као флуоресцентно зелене. Употребом филтера за тетраметилродамин-5-изотиоцијанат, ћелије *C.m. subsp. sepedonicus*, обојене са СуЗ, виде се као флуоресцентно црвене. Упоредити морфологију ћелија узорка с морфологијом ћелија позитивних контрола. Ћелије морају бити

јасно флуоресцентне и у потпуности обојене. Ако дође до одступања у обојености, FISH тест се мора поновити. Прегледати сваки бунарчић уздуж и попречно под нормалним углом и дуж спољне ивице. За узорке у којима је видљив мали број ћелија или их уопште нема прегледати најмање 40 микроскопских видних поља.

5.3.2. Уочити да ли су видљиве јасно флуоресцентне ћелије у бунарчићима морфологије карактеристичне за *C.m. subsp. sepedonicus* (види веб страницу: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Интензитет флуоресценције мора бити једнак или јачи него код позитивне контроле. Ћелије које нису у потпуности обојене или су слабе флуоресценције се не узимају у обзир.

5.3.3. Уколико постоји сумња да је дошло до контаминације, тест се мора поновити (нпр. све плочице у серији због контаминације пуфера показују позитивне ћелије или су позитивне ћелије пронађене изван бунарчића, на површини плочице).

5.3.4. Постоји неколико проблема у вези са специфичношћу FISH теста. У концентрованом екстракту издвојених конуса пупчаних делова кртоле или стабљике увек се очекује и присуство популација флуоресцентних ћелија са нетипичном морфологијом или унакрсна реакција са сапрофитним бактеријама сличне величине и грађе као *C.m. subsp. sepedonicus*, мада знатно ређе него код IF теста.

5.3.5. У обзир се узимају само флуоресцентне ћелије типичне величине и морфологије.

5.3.6. Тумачење резултата FISH теста:

а) резултати FISH теста сматрају се важећим ако се у свим позитивним и ни у једној негативној контроли применом FISH филтра уочава присуство јасно зелених флуоресцентних ћелија чија је величина и морфологија типична за *C.m. subsp. sepedonicus* и ако се применом филтера за родамин уочавају јасне црвене флуоресцентне ћелије. Ако се уоче јасне ћелије карактеристичне морфологије, одредити просечни број типичних флуоресцентних ћелија по микроскопском видном пољу и израчунати број типичних ћелија по ml ресуспендованог талога (Поглавље VI овог прилога). Потенцијално позитивним се сматрају узорци са најмање 5×10^3 типичних ћелија по ml ресуспендованог талога и потребна су им даља тестирања. Негативним се сматрају узорци са мање од 5×10^3 типичних ћелија по ml ресуспендованог талога;

б) FISH тест је негативан ако се применом филтера за родамин не уоче снажно флуоресцентне црвене ћелије чија је величина и морфологија типична за *C.m. subsp. sepedonicus*, под условом да се применом филтера за родамин уоче типичне изразито флуоресцентне црвене ћелије у препаратима позитивне контроле.

6. PCR тест

Начела – када се употребом PCR теста као првог теста провере добије позитиван резултат, IF тест се користи као други обавезни тест провере. Ако се коришћењем PCR теста као другог теста провере добије позитиван резултат, за постављање коначне дијагнозе треба обавити даље тестирање према дијаграму тока.

Коришћење ове методе као главног теста провере препоручује се само уколико је доступна специјализована експертиза.

Напомена:

Прелиминарна тестирања применом ове методе треба да омогуће поновљиву детекцију најмање 10^3 до 10^4 ћелија *S.m. subsp. sepedonicus* по ml које су додате екстракту узорка претходно доказаног као негативног.

За постизање највећег степена осетљивости и специфичности у свим лабораторијама, потребно је извођење огледа за стандардизацију (оптимизацију) методе. Користити потврђене и одобрене реагенсе и протоколе за PCR. Пожељно је одабрати метод који подлеже интерној контроли. Предузети одговарајуће мере опреза како би се избегла контаминација узорка циљном ДНК. PCR тест треба да обављају искусни стручњаци, у специјализованим лабораторијама за молекуларну биологију.

Негативне контроле (за екстракцију ДНК и PCR поступак) треба увек у поступку обрадити последње како би се утврдило да ли је евентуално дошло до било каквог преношења ДНК.

У PCR тест укључити следеће негативне контроле:

- екстракт узорка у коме претходно током тестирања није доказано присуство *S. m. subsp. Sepedonicus*;
- пуфер коришћен за екстракцију бактерије и ДНК из узорка;
- PCR-реакциони микс.

У PCR тест укључити следеће позитивне контроле:

- аликоте ресуспендованих талога у које је додата *S.m. subsp. sepedonicus* (Поглавље ИВ овог прилога);
- суспензију од 10^6 ћелија по ml вирулентног изолата *S.m. subsp. sepedonicus* у води (нпр. NSRPB 2140 или NSRPB 4053);
- ако је могуће, у PCR тесту користити и ДНК екстрахован из позитивних контролних узорака.

Да би се избегла могућа контаминација, позитивне контроле припремити просторно одвојено од узорака за тестирање.

С обзиром да примена PCR протокола захтева коришћење екстракта узорака са што мање земље, пре почетка процедуре извођења теста, узорке кромпира је пожељно добро опрати.

6.1. Методе пречишћавања ДНК

Позитивну и негативну контролу користити на претходно описан начин. Контролни материјал припремити на исти начин као и узорке.

Доступне су различите методе пречишћавања циљане ДНК из комплексних супстрата узорка у циљу уклањања инхибитора PCR реакције и других ензимских реакција и методе концентровања циљане ДНК у екстракту узорка.

Метода која следи је стандардизована за коришћење са потврђеном и одобреном PCR методом у (Поглавље VIII овог прилога).

а) Метода према Пастрику (2000):

1. Пипетом одмерити 220 μ l лизис пуфера В100 mM NaCl, 10mM Трис-HCl (pH 8,0), 1mM ЕДТА (pH 8,0)] у Eppendorf тубу од 1,5 ml;
2. Додати 100 μ l екстракта узорка и ставити у термоблок или водено купатило на 95 $^{\circ}$ C 10 минута;
3. Ставити тубу на лед у трајању од пет минута;
4. Додати 80 μ l основног шток раствора Lysozyme (50 мг лизозима по ml у 10 mM Трис HCl, pH 8,0) и инкубирати на 37 $^{\circ}$ C 30 минута;
5. Додати 220 μ l раствора Easy DNA[®] А (Инвитроген), добро измешати на вортексу и инкубирати на 65 $^{\circ}$ C 30 минута;
6. Додати 100 μ l раствора Easy DNA[®] Б (Инвитроген) и снажно измешати на вортексу до постизања униформног вискозитета узорка;
7. Додати 500 μ l хлороформа, измешати на вортексу док се вискозитет не умањи и смеша постане хомогена;
8. Центрифугирати на 15.000 g 20 минута на 4 $^{\circ}$ C да се поделе фазе и створи међуфаза;
9. Пренети горњу фазу у нову Eppendorf тубу;
10. Додати 1 ml 100% етанола (-20 $^{\circ}$ C), кратко промешати на вортексу и инкубирати на леду 10 минута;
11. Центрифугирати на 15.000 g 20 минута на 4 $^{\circ}$ C и уклонити етанол од талоба;
12. Додати 500 μ l 80% етанола (-20 $^{\circ}$ C) и промешати окретањем тубе;
13. Центрифугирати на 15.000 g 10 минута на 4 $^{\circ}$ C сачувати талог, а уклонити етанол;
14. Оставити талог да се суши на ваздуху или у вакуумској центрифуги (ДНК спеед вац);
15. Ресуспендовати талог у 100 μ l стерилне Ултра чисте воде и оставити на собној температури најмање 20 минута;
16. Чувати на -20 $^{\circ}$ C до извођења PCR-а;
17. Било који бели талог издвојити центрифугирањем и за PCR употребити 5 μ l супернатанта који садржи ДНК;

б) друге методе – за екстракцију ДНК могу се применити и друге методе (нпр. Qiagen DNeasy Plant Kit), уколико је доказана еквивалентност у прочишћавању ДНК из контролних узорка који садрже 10^3 до 10^4 патогених ћелија по ml.

6.2. PCR

6.2.1. Припремити узорке за тестирање и контролне узорке за PCR према одобреним протоколима (Поглавље VIII овог прилога). Припремити разређење екстракта ДНК из узорка 1:10 у Ултра чистој води).

6.2.2. У неконтраминираним простору припремити одговарајући реакциони микс за PCR према објављеним протоколима (Поглавље VIII овог прилога). Одобрени PCR протокол је мултиплекс реакција која такође укључује унутрашњу PCR контролу.

6.2.3. Додати 5 μ l екстракта ДНК у стерилне епрувете за PCR, за PCR реакцију која се изводи у 25 μ l.

6.2.4. Укључити и негативну контролу која садржи само PCR реакциони микс, а уместо узорка додати исти извор Ултра чисте воде који је коришћен за припрему PCR реакционог микса.

6.2.5. Ставити епрувете у уређај за PCR (thermal cycler) и покренути стандардизовани PCR програм (Поглавље VIII овог прилога).

6.3. Анализа PCR продуката

6.3.1. Умножене PCR продукте раздвојити електрофорезом у агарозном гелу. У сваки бунарчић 2,0%-тног (v/v) агарозног гела у трис-ацетат ЕДТА пуферу (ТАЕ) нанети најмање 12 μ l ампликона ДНК из сваког узорка, помешане с 3 μ l боје и пропустити уз напон од 5 до 8 V В/цм. Употребити одговарајући ДНК маркер, нпр. 100 бп ладдер (Поглавље VIII овог прилога).

6.3.2. Обојити електрофоретске траке ДНК у гелу потапањем гела у етидиум бромид (0,5 мг/л) у трајању од 30 до 45 минута. Предузети одговарајуће мере опреза при раду са овим мутагеном.

6.3.3. Обојени гел прегледати на краткоталасном УВ трансилуминатору (нпр. $\lambda = 302$ nm), и потражити умножене фрагменте очекиване дужине (Поглавље VIII овог прилога) и документовати их.

6.3.4. Приликом сваког новог налаза/случаја проверити аутентичност умноженог PCR продукта извођењем анализе уз помоћ рестрикционих ензима на узорку преостале умножене ДНК и то инкубацијом при оптималној температури и у оптималном времену с одговарајућим ензимом и пуфером (Поглавље VIII овог прилога). Настале фрагменте раздвојити електрофорезом у агарозном гелу како је претходно наведено и после бојења етидиум бромидом на УВ трансилуминатору посматрати карактеристичну матрицу (образац) рестрикционих фрагмената и упоредити је са позитивном контролом пре и после раздвајања.

Тумачење резултата PCR теста:

PCR тест је негативан ако у тестираном узорку није видљив PCR продукт очекиване дужине који је специфичан за *S.m. subsp. sepedonicus*, али је видљив у свим позитивним контролним узорцима (код мултиплекс PCR-а са прајмерима за унутрашњу контролу који су специфични за биљку домаћина: у тестираном узорку се мора умножити други продукт PCR-а очекиване величине).

PCR тест је позитиван ако је видљив PCR продукт који је специфичан за *S.m. subsp. sepedonicus* и који је очекиване дужине и рестрикционог обрасца, под условом да није умножен ни у једном узорку који представља негативну контролу. Поуздана потврда позитивног резултата представља и успешно понављање теста с другим паром PCR прајмера (тачка 9. подтачка 9.3. овог поглавља).

Напомена:

Уколико се очекивани фрагмент (позитивна реакција) добије у узорку позитивне контроле која садржи *S.m. subsp. sepedonicus* у води, а негативни резултат добије у узорку позитивне контроле која садржи *S.m. subsp. sepedonicus* у екстракту кромпира, претпоставља се да је дошло до инхибиције PCR реакције. У мултиплекс PCR протоколима који се изводе употребом унутрашњих PCR контрола, сматра се да је дошло до инхибиције реакције ако није добијен ни један од два продукта.

Такође, ако се из једне или више негативних контрола добије очекивани продукт, може се сумњати да је дошло до контаминације.

7. Биолошки тест

Напомена:

Прелиминарно тестирање овом методом треба да омогући поновљиво откривање присуства 10^3 до 10^4 цфу *S.m. subsp. sepedonicus* по ml, додатих екстрактима узорака који су у ранијем тестирању били негативни (за припрему видети Поглавље ИВ овог прилога).

Највећа осетљивост детекције може се очекивати ако се користе свеже припремљени екстракти узорака и оптимални услови за раст и развој патогена. Међутим, ова метода може успешно да се примени и употребом екстраката који су чувани са глицеролом на температури од -68 до -86 °C.

Неке сорте плавог патлицана представљају одличну селективну подлогу за обогаћење и раст *S.m. subsp. sepedonicus*, чак и у одсуству симптома, а уједно су и одличне за утврђивање биљака домаћина. Услови раста треба да су оптимални како би се умањио ризик од добијања лажно негативних резултата.

Детаљи у вези са гајењем биљака се налазе у (Поглавље X овог прилога).

7.1. На преосталу количину ресуспендованог талоба остављеног за тестирање из 3.1.6 или 3.2.5 применити методу инокулације зарезивањем или методу инокулације ињекцијом. Користити само биљке плавог патлицана у стадијуму два до три права листа, до потпуне развијености

трећег правога листа. По једном узорку потребно је 15 до 25 биљака патлицана, како би се у потпуности искористио ресуспендовани талог и осигурала ефикасна инокулација.

7.2. У циљу смањења тургора, биљке патлицана не заливати један до два дана пре инокулације.

7.3. Инокулација зарезивањем.

7.3.1. Држећи биљку међу прстима, пипетом нанети капљицу (око 5–10 μ l) ресуспендованог талога на стабљику и то између котиледона и првог листа.

7.3.2. Стерилним скалпелом направити дијагонални рез, дуг око 1 цм и дубок око 2/3 дебљине стабљике, почевши од нанесене капљице ресуспендованог талога.

7.3.3. Чврсто затворити рез стерилним вазелином из шприца.

7.4. Инокулација ињекцијом.

Стабљике плавог патлицана инокулисати непосредно изнад котиледона ињекцијом с танком иглом (не мањом од 23Г). Узорак поделити на биљке плавог патлицана, тако да свака биљка добије одговарајућу количину.

7.5. Позитивна контрола: пет биљака инокулисати суспензијом од 10⁵ до 10⁶ ћелија по ml воде познате културе *S.m. subsp. sepedonicus* и, када је могуће, екстрактом природно зараженог ткива кртола (тачка 4. овог поглавља) истом методом инокулације.

7.6. Негативна контрола: пет биљака инокулисати истом методом инокулације користећи стерилни пелет пуфер (пуфер за растварање талога).

7.7. Биљке гајити у карантинским просторијама до четири седмице на 18 до 24 °C, уз довољну количину светла и високу влажност (70 до 80%) и адекватно заливати како би се спречило накупљање воде или увенуће због недостатка воде. *S.m. subsp. sepedonicus* се не развија на температурама изнад 30 °C, а оптимална температура је 21 °C. У циљу спречавања унакрсне контаминације, биљке позитивне и негативне контроле гајити на јасно одвојеним столовима у стакленику или полицама у комори за раст или, у случају да је простор ограничен, побринути се да су биљке јасно одвојене између појединих поступака у току извођења процедуре. Ако се биљке за различите узорке морају гајити близу једна другој, раздвојите их погодним платном. Пазити да не дође до унакрсне контаминације приликом прихрањивања, заливања, прегледања и сваког другог поступка с биљкама. Од кључне важности је да у стакленицима и коморама за гајење не буде никаквих инсеката јер они могу пренети бактерију с узорка на узорак.

7.8. Појаву симптома редовно проверавати после седам дана од инокулације. Пребројати биљке које показују симптоме. *S.m. subsp. sepedonicus* изазива увенуће листова патлицана које може почети као увелост ивица или између нерава листова. Увенуло ткиво у почетку изгледа тамнозелено или прошарано, али касније постаје бледо па некротично. Увела површина између лисних нерава често изгледа масно, као да је натопљена водом. Некротично ткиво често има светложуту ивицу. Биљке не угину увек; што је период пре него што се симптоми почну развијати дужи, већа је могућност преживљавања. Биљке могу прерасти заразу. Младе

биљке патлићана много су осетљивије на присуство ниског нивоа популација *C.m. subsp. sepedonicus* него старије биљке; због тога се користе биљке у или непосредно пре фазе три права листа.

Увенуће може бити изазвано и популацијом других бактерија или гљивица које су присутне у екстракту ткива кртола. То су: Ралстонија соланацеарум, Ерњинија царотовора субсп. царотовора и Ерњинија царотовора субсп. атросептица, Ерњинија цхрусантхеми, Пхома ехигуа вар. фовеата, као и популације великог броја сапрофитних бактерија. Нарочито Ерњинија цхрусантхеми може изазвати симптоме на листовима и увенуће које је врло слично симптомима *C.m. subsp. sepedonicus*. Једину разлику представља појава тамњења-црњења стабљика у случају инфекција бактеријом Ерњинија цхрусантхеми. Друге врсте увенућа се разликују од оних које проузрокује *C.m. subsp. sepedonicus* зато што цели листови или целе биљке врло брзо вену. *C.m. subsp. sepedonicus* се од Ерњинија спп може брзо и лако раздвојити и извођењем бојења и/или реакције по Грам-у.

7.9. Одмах по уочавању присуства симптома на биљкама патлићана, потребно је извршити ре-изолацију, користећи делове увенулог ткива лишћа или ткива стабљике. Листове и стабљике биљака патлићана површински дезинфиковати брисањем са 70%-тним етанолом. Ткиво измацерирати и применити IF или PCR тест на соку патлићана и изолацију патогена на погодну (селективну) хранљиву подлогу (тачка 8. овог поглавља). Такође се може применити и бојење/реакција по Грам-у (Поглавље XI овог прилога). Извршити идентификацију чисте културе *C.m. subsp. sepedonicus* и проверу патогености (тачке 9. и 10. овог поглавља).

7.10. У одређеним околностима, нарочито у условима неповољним за раст и развој биљака, могуће је да се, чак и после периода инкубације од четири недеље *C.m. subsp. sepedonicus* налази латентно у биљкама патлићана. Ако ни после четири недеље од инокулације не дође до појаве симптома на биљкама треба извести IF/PCR тест на збирном узорку састављеном од делова стабљике (1 цм од сваке биљке за тестирање, узет изнад места инокулације). Ако је тест позитиван, поновно извршити изолацију патогена на одговарајућу (селективну) хранљиву подлогу, према поступку из тачке 8. овог прилога. Извршити идентификацију чисте културе *C.m. subsp. sepedonicus* и проверу патогености (тачке 9. и 10. овог поглавља).

Тумачење резултата биолошког теста – валидни резултати биолошког теста се добијају ако биљке у позитивној контроли показују типичне симптоме, ако се из тих биљака може поново издвојити бактерија и ако на биљкама негативне контроле не дође до појаве симптома.

Биолошки тест је негативан ако тестиране биљке нису заражене *C.m. subsp. sepedonicus*, а под условом да је утврђено присуство *C.m. subsp. sepedonicus* у позитивним контролама.

Биолошки тест је позитиван ако су тестиране биљке заражене *C.m. subsp. sepedonicus*.

8. Изолација *C.m. subsp. sepedonicus*

Напомена:

Дијагноза се може потврдити само ако се *C.m. subsp. sepedonicus* изолује, а затим изврши и идентификација добијеног изолата (тачка 9. овог поглавља), и ако се потом потврди и

патогеност добијеног изолата (тачка 10. овог поглавља). Иако је *C.m. subsp. sepedonicus* захтеван организам, може се изоловати из ткива са карактеристичним симптомима. Приликом изолације лако може доћи до прерастања колоније овог патогена са колонијама брзо растућих сапрофитних бактерија па је зато изолација директно из екстракта ткива кртола или стабљике тешка. Директна изолација *C.m. subsp. sepedonicus* могућа је коришћењем одговарајуће селективне хранљиве подлоге и разређења ресуспендованог талога добијеног из издвојеног конуса пупчаног дела кртоле или из стабљика кромпира.

Изолације је потребно извршити из свих кртола или делова стабљике кромпира са симптомима као и из тестираних биљака патлиџана код којих нису примећени симптоми или је IF/PCR тест из збирног узорка био позитиван (тачка 7. подтачка 7.10.). По потреби, треба користити и мацерирање стабљика патлиџана, према прописаној процедури.

Позитивна контрола: припремити децимална разређења суспензије 10⁶ цфу помл *C.m. subsp. sepedonicus* (нпр. NCPPB 4053 или ПД 406). Позитивне контроле припремити потпуно одвојено од узорка који се тестирају, да би се избегла могућност контаминирања узорка.

Пре употребе за рутинско тестирање узорка, проверити погодност сваке серије селективне хранљиве подлоге за раст и развој патогена. Контролни материјал подвргнути истим принципима тестирања као и узорак или узорке.

8.1. Гајење на селективној хранљивој подлози

8.1.1. Из одвојене количине од 100 μ l ресуспендованог талога добијеног из кртоле кромпира или биљног сока биљака патлиџана припремити децимална разређења у пелет пуферу (пуфер за растварање талога из тачке 3. овог поглавља).

8.1.2. Изолација из ресуспендованог талога, без претходног разређивања обично не успева због тешког гајења *C.m. subsp. sepedonicus* и велике конкурентске способности сапрофита. С обзиром да је у зараженом ткиву биљке бактерија обично присутна у популацијама високог нивоа, сапрофити се могу одстранити разређивањем, док патоген остаје. Стога се препоручује наношење 100 μ l из сваког узорка (код употребе Петријевих шоља пречника 90 mm, док за Петријеве шоље других величина треба прилагодити количину), 1/100 до 1/10 000 разређене суспензије на храњиву подлогу MTNA или на NCP-88 (Поглавље VII овог прилога), техником размаза.

Напомена:

Алтернативна могућност је размаз почетне количине од 100 μ l ресуспендованог талога на прву подлогу, а затим прављење размаза истим штапићем на другој и трећој подлози, при чему се на њих наносе остаци екстракта с претходне подлоге. На овај начин се добија ефекат сличан ефекту коришћења разређења.

8.1.3. Засејану подлогу инкубирати у мраку на 21 до 23 °C.

8.1.4. Прва провера подлога и процена појаве и развоја колонија налик *C.m. subsp. sepedonicus*, у поређењу са подлогама позитивне контроле, се врши после 3 дана, а наредне процене после 5, 7, и евентуално 10 дана.

8.2. Пречишћавање сумњивих колонија

Напомена:

Колоније сличне *C.m. subsp. sepedonicus* треба даље пренети на храњиву подлогу УГМ ако ће се користити за инокулацију патлицана и/или даљу идентификацију; то треба учинити пре него на подлогама дође до прерастања колонија, односно најбоље после три до пет дана.

8.2.1. Размазом нанети колоније сличне *C.m. subsp. sepedonicus* на једну од следећих хранљивих подлога: хранљиви агар са додатком декстрозе (користи се само за пресејавање изолата), агар са додатком квасца, пептона и глукозе, агар са додатком екстракта квасца и минералних соли. Састав хранљивих подлога наведен је у Поглављу VII овог прилога.

Засејану подлогу инкубирати на 21 °C до 24 °C у трајању до 10 дана. *C.m. subsp. sepedonicus* споро расте, обично ствара кремASTE, куполасте колоније са шиљатим врхом. Фотографије типичних колонија *C.m. subsp. sepedonicus* се могу видети на веб страници <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

8.2.2. Пречишћавање изолата се постиже поновним размазима и исцрпљивањем на одговарајућим хранљивим подлогама. Ниво пораста се повећава пресејавањем. Типичне колоније су кремасто-беле или боје слоноваче, понекад жуте, заокружене, глатке, повишене, конвексно-куполасте, слузаво-течне, с целим ивицама и обично 1 до 3 mm у пречнику. Једноставно бојење по Грам-у (Поглавље XI овог прилога) може помоћи при избору колонија за даље тестирање.

8.2.3. Извршити идентификацију изабраних колонија (тачка 9. овог поглавља) и проверити патогеност изолата (тачка 10. овог поглавља).

9. Идентификација

Идентификација чисте културе добијених изолата *C.m. subsp. sepedonicus* врши се коришћењем најмање два од наведених тестова који се заснивају на различитим биолошким принципима. Према потреби, укључити познате референтне изолате за сваки тест.

9.1. Одгајивачки и ензимски тестови за идентификацију

Фенотипска својства универзално присутна или одсутна код бактерије *C.m. subsp. sepedonicus* утврдити према методама Lelliott и Stead (1987), Клемент и сар. (1990), Schaad и сар. (2001), непознати аутор (1987) и сл.

Све хранљиве подлоге инкубирати на 21 °C и прегледати након шест дана. Ако не дође до раста колонија, инкубирати до 20 дана. У све тестове треба укључити познату контролу *C.m. subsp. sepedonicus*. Одгајивачке и физиолошке тестове изводи коришћењем културе са храњивог агара. Морфолошка упоређења извршити у односу на културе на храњивом агару са додатком декстрозе.

Тестови	Очекивани резултати
Тест оксидације/ферментације (О/Ф)	инертан или слабо оксидативан
Активност оксидазе	–
Раст на 37 °C	–
Активност уреазе	–
Хидролиза ескулина	+
Хидролиза скроба	– или слаба
Толерантност на 7% раствора NaCl	–
Стварање индола	–
Активност каталазе	+
Стварање H ₂ S	–
Коришћење цитрата	–
Растварање желатина	–
Стварање киселине из глицерола	–
Стварање киселине из лактозе	– или слаба
Стварање киселине из рамнозе	–
Стварање киселине из салицина	–
Бојење по Граму (Поглавље XI)	+

9.2. IF тест

а) припремити суспензију од приближно 10⁶ ћелија по ml у IF пуферу(Поглавље V овог прилога);

б) припремити двострука разређења раствора погодног антисерума;

в) применити IF поступак (тачка 4. овог поглавља);

г) IF тест је позитиван ако је IF титар културе једнак титру позитивне контроле.

9.3. PCR тест

а) припремити суспензију од приближно 10⁶ ћелија по ml у Ултра чистој води;

б) загрејати 100 µl суспензије ћелија бактерије у затвореним епруветама у термоблоку или у врелом воденом купатилу четири минута на 100 °C.Разлагање ћелија се, по потреби, може

убрзати додавањем свеже припремљеног NaOH до коначне концентрације од 0,05M. До употребе узорци се могу чувати на -16 до -24 °C;

в) употребити одговарајуће PCR процедуре за умножавање специфичних фрагмената *S.m. subsp. sepedonicus* (нпр. Пастрик, 2000; видети Поглавље VIII овог прилога; Ли и де Боер, 1995; Милс и сар., 1997; Пастрик и Раинеу, 1999; Сцхаад и сар., 1999);

г) Идентификација *S.m. subsp. sepedonicus* је позитивна ако су PCR производи исте величине и имају исти полиморфизам дужине рестрикционих фрагмената као и позитивни контролни изолат.

9.4. FISH тест

а) припремити суспензију од приближно 10⁶ ћелија по ml Ултра чисте воде;

б) применити FISH поступак (тачка 5. овог поглавља);

в) FISH тест је позитиван ако су постигнуте реакције културе и позитивне контроле једнаке.

9.5. Профилирање масних киселина (ФАП)

а) Културу гајити на триптиказа-соја-агару (Оцоид) 72 сата на 21 °C (+/- 1 °C);

б) применити одговарајући ФАП поступак (Јансе, 1991; Стеад, 1992);

в) ФАП тест је позитиван ако је профил тестиране културе идентичан профилу позитивне контроле. Присуство карактеристичних масних киселина: 15:1 Антеисо А, 15:0 Исо, 15:0 Антеисо, 16:0 Исо, 16:0 и 17:0 Антеисо, у великој мери указује да се ради о *S.m. subsp. sepedonicus*. Родови бактерија као Цуртобацтериум, Артхробацтер и Мицроцоццус такође имају неке од ових киселина, али 15:1 Антеисо А је киселина која се ретко може пронаћи у овим бактеријама, али се појављује у свим бактеријама рода Цлавибацтер и то између 1 до 5%. Код *S.m. subsp. sepedonicus* вредност је обично око 5%.

9.6. БОХ-PCR

а) припремити суспензију од приближно 10⁶ ћелија по ml Ултра чисте воде;

б) применити тест у складу с процедуром (Смитх и сар., 2001).

10. Тест потврде

Тест провере патогености се користи за коначно потврђивање присуства *S.m. subsp. sepedonicus* и за процену вирулентности култура идентификованих као *S.m. subsp. sepedonicus*.

10.1. Припремити инокулум од приближно 10⁶ ћелија по ml из култура изолата који се тестира, старости три дана и одговарајућег изолата позитивне контроле *S.m. subsp. sepedonicus*.

10.2. Инокулисати стабљике 5 до 10 ml младих сејанаца плавог патлиџана у фази 3 прва листа (тачка 7. подтачка 7.3. или 7.4. овог поглавља).

10.3. Инокулисане сејанце инкубирати на 18 до 24 °C уз довољну количину светла и високу релативну влажност и адекватно заливати како би се избегло накупљање воде или стрес од суше (тачка 7. подтачка 7.7. овог поглавља). Код инокулације чистим културама, типично увенуће се појављује у року од две недеље, док се биљке које не испољавају симптоме (видети тачка 7. подтачка 7.8. овог поглавља) после тог времена инкубирају још недељу дана на температурама повољним за раст плавог патлицана, али не вишим од 25 °C (Поглавље X овог прилога). Ако симптоми нису присутни ни после три недеље, добијена култура се не може потврдити као патогени изолат *S.m. subsp. sepedonicus*.

10.4. Изолацију из биљака са симптомима извршити одстрањивањем дела стабљике дужине 2 цм изнад места инокулације који се потом уситни и раствори у малој количини стерилне дестиловане воде или 50 mM фосфатном пуферу (Поглавље V овог прилога). Изолација патогена се потом врши размазом добијеног мацерата на МТНА и УПГА подлоге (Поглавље VII овог прилога), инкубирањем три до пет дана на 21 до 23 °C и утврђивањем да ли су формиране типичне колоније бактерије *S.m. subsp. sepedonicus*.

Поглавље III

ЛАБОРАТОРИЈЕ УКЉУЧЕНЕ У ОПТИМИЗАЦИЈУ

И ВАЛИДАЦИЈУ ПРОТОКОЛА

Лабораторија (1)	Место	Држава
Агентур фјур Гесундхеит унд Ернährунгссицхерхеит	Беч и Линз	Аустрија
Департемент Гевасбесцхерминг	Мерелбеке	Белгија
Плантедиректоратет	Лунгбу	Данска
Централ Сциенце Лаборатору	Њорк	Енглеска
Сцоттисх Агрикултурал Сциенце Агенцу	Единбургх	Шкотска
Лаборатоире Национал де ла Протеџион дес Вегетаух, Унитэ де Бацтэриологије	Ангерс	Француска
Лаборатоире Национал де ла Протеџион дес Вегетаух, Статион де Куарантаине де ла		
Потте де Терре	Ле Рхеу	Француска
Биологисцхе Бундесансталт	Клеинмацхноњ	Немачка
Пфланзенсцхутзамт Ханновер	Ханновер	Немачка

Плантензиектенкундиге Диенст	Вагенинген	Холандија
Норвегиан Цроп Ресеарчх Институте,		
Плант Протецтион Центре	Аас	Норвешка
Дирец]о-Герал де Протец]о дас Цултурас	Лисбон	Португалија
Национални институт за биологијо	Љубљана	Словенија
Центро де Диагностицо де Алдеаррубиа Саламанца		Шпанија

*1 За контакт са научницима: видети веб страницу:
[хттп://форум.еуропа.еу.инт/Публиц/ирц/санцо/Хоме/маин](http://форум.еуропа.еу.инт/Публиц/ирц/санцо/Хоме/маин)

Поглавље IV

ПРИПРЕМА ПОЗИТИВНИХ И НЕГАТИВНИХ

КОНТРОЛА ЗА ОСНОВНЕ ТЕСТОВЕ ПРОВЕРЕ

PCR/IF И FISH ТЕСТОВИ

Направити суспензију културе вирулентног изолата *C.m. subsp. sepedonicus*(NCPPV 4053 или ПД 406) гајеног 72 сата на МТНА основној хранљивој подлози у 10 mM фосфатном пуферу концентрације приближно $1-2 \times 10^8$ цфу/ml. То је обично слабо мутна суспензија оптичке густине 0,20 на 600 нм.

Извадити конус пупчаног дела из 200 кртола беле сорте кромпира за које је познато да нису заражене бактеријом *C.m. subsp. sepedonicus*.

Обрадити конусе уобичајеном методом и ресуспендовати талог у 10 ml.

Припремити десет стерилних микроепрувета од 1,5 ml са 900 μ л ресуспендованог талоба.

У прву микроепрувету додати 100 μ л суспензије *C.m. subsp. sepedonicus* и измешати на вортексу.

У следећих пет микроепрувета припремити децимална разређења бактеријске суспензије.

Ових шест микроепрувета са зараженим екстрактом користити за позитивну, а четири микроепрувете са незараженим екстрактом користити за негативну контролу. У складу с тим, означити микроепрувете.

У микроепруветама од 1,5 ml припремити аликвоте од 100 μ л тако да се добије девет копија сваког контролног узорка. До употребе чувати на -16 до -24°C.

Присуство и количину присутне *C.m. subsp. sepedonicus* у контролним узорцима прво потврдити IF тестом.

За PCR тест, извршити екстракцију ДНК у позитивним и негативним контролним узорцима за сваку серију узорака за тестирање.

За IF и FISH тестове, извршити тестирање позитивних и негативних контролних узорака за сваку серију узорака за тестирање. Код IF, FISH и PCR тестова, потребно је утврдити присуство *S.m. subsp. seredonicus* у концентрацији од најмање 10³ и 10⁴ ћелија/ml код позитивних контрола и ни у једној негативној контроли.

Поглавље V

Пуфери за тест процедуре

Стерилисани пуфери који нису отворани могу се чувати до једне године.

1. Пуфери за екстракцију

1.1. Екстракциони пуфер

(50 mM фосфатни пуфер, pH 7,0)

Овај пуфер се користи за екстракцију бактерије из биљног ткива хомогенизацијом или трешењем.

Na₂HPO₄ (анхидровани) 4,26 г

KH₂PO₄ 2,72 г

Дестилована вода 1,00 Л

Растворити састојке, проверити pH и стерилисати у аутоклаву на 121°C 15 минута.

Следећи састојци могу бити корисни:

	Намена	Количина (по Л)
Пахуљице Луброл	Дефлокулант*	0,5 г
ДЦ силикон против стварања пене	Средство против стварања пене *	1,0 ml
Тетранатријум пирофосфат	Антиоксидант	1,0 г
Поливинилпиролидон-40000 (ПВП-40)	Везивање PCR инхибитора	50 г

* За употребу код методе екстракције хомогенизацијом

1.2. Пелет пуфер (Пуфер за растварање талога-10 mM фосфатни пуфер, pH 7,2)

Овај пуфер се користи за ресуспендовање и разређивање екстракта конуса извађених из пупчаних делова кртола кромпира, после концентровања талога центрифугирањем.

Na₂XPO₄ x 12X₂O 2,7 г

NaX₂PO₄ x 2X₂O 0,4 г

Дестилована вода 1,00 Л

Растворити састојке, проверити рН и стерилисати у аутоклаву на 121°C 15 минута.

2. Пуфери за IF тест

2.1. IF пуфер (10 mM фосфатни пуфер с додатком соли (ПБС), рН 7,2)

Овај пуфер се користи за разређивање антитела.

Na₂XPO₄ x 12X₂O 2,7 г

NaX₂PO₄ x 2X₂O 0,4 г

NaCl 8,0 г

Дестилована вода 1.0 Л

Растворити састојке, проверити рН и стерилисати у аутоклаву на 121°C 15 минута.

2.2. IF пуфер – Tween

Овај пуфер се користи за испирање IF плочица.

IF пуферу додати 0,1% Tween 20.

2.3. Фосфатни пуфер с глицеролом рН 7,6

Овај пуфер се користи као раствор за прекривање бунарчића у IF тесту како би се појачала флуоресценција.

Na₂XPO₄ x 12X₂O 3,2 г

NaX₂PO₄ x 2X₂O 0,15 г

Глицерол 50 ml

Дестилована вода 100 ml

Комерцијални раствори нпр. Вецтасхиелд® (Вецтор Лабораториес) или Цитифлуор® (Леица).

Поглавље VI

ОДРЕЂИВАЊЕ НИВОА КОНТАМИНАЦИЈЕ

У IF И FISH ТЕСТОВИМА

1. Избројати просечан број типичних флуоресцентних ћелија по видном пољу(с)

2. Израчунати број типичних флуоресцентних ћелија по бунарчићу микроскопске плочице (С)

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

где је

C = површина бунарчића IF плочице са више бунарчића и

s = површина поља објектива.

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

где је

i = коефицијент поља (варира од 8 до 24 зависно од типа окулар)

K = коефицијент тубе (цеви) (1 или 1,25)

G = повећање објектива (100x, 40x итд.).

Израчунати број типичних флуоресцентних ћелија по ml ресуспендованог талога (N)

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

где је

u = запремина ресуспендованог талога у сваком бунарчићу, и

F = фактор разређења ресуспендованог талога.

Поглавље VII

ХРАНЉИВЕ ПОДЛОГЕ ЗА ИЗОЛАЦИЈУ И ГАЈЕЊЕ *S. M. SUBSP. SEPEDONICUS*

1. Опште хранљиве подлоге

1.1. Хранљиви агар (НА)

Хранљиви агар (Difco) 23,0 г

Дестилована вода 1,0 L

Растворити састојке и стерилисати у аутоклаву на 121 °C 15 минута.

1.2. Хранљиви агар са декстрозом (НДА)

Difco бацто хранљиви агар који садржи 1% Д(+) глукозе (монохидрата).

Стерилисати у аутоклаву на 115 °C 20 минута

1.3. Агар са квасцем, пептоном и глукозом(УПГА)

Екстракт квасца (Difco) 5,0 г

Бацто пептон (Difco) 5,0 г

Д(+)
глюкоза (монохидрат) 10,0 г

Агар Бацто (Difco) 15,0 г

Дестилисана вода 1,0 Л

Растворити састојке и стерилисати у аутоклаву на 121 °С 15 минута.

1.4. Агар са екстрактом квасца и минералним солима (УГМ)

Бацто екстракт квасца (Difco) 2,0 г

Д(+)
глюкоза (монохидрат) 2,5 г

K_2HPO_4 0,25 г

KH_2PO_4 0,25 г

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 г

$MnCO_4 \cdot X_2O$ 0,015 г

$NaCl$ 0,05 г

$FeSO_4 \cdot 7X_2O$ 0,005 г

Vacto agar (Difco) 18 г

Дестилована вода 1,0 Л

Растворити састојке и стерилисати 0,5 литара хранљиве подлоге у аутоклаву на 121 °С 15 минута.

2. Селективне хранљиве подлоге које су прошле валидацију

2.1. МТНА хранљива подлога

Осим ако није другачије наведено, сви састојци су из БДХ.

Екстракт квасца (Difco) 2,0 г

Манитол 2,5 г

K_2HPO_4 0,25 г

KH_2PO_4 0,25 г

$NaCl$ 0,05 г

$MgCO_4 \cdot 7X_2O$ 0,1 г

$MnCO_4 \cdot X_2O$ 0,015 г

$FeSO_4 \cdot 7X_2O$ 0,005 г

Агар (Охоид но. 1) 16,0 г

Дестилована вода 1,0 Л

Растворити састојке, подесити рН на 7,2. Након стерилизације у аутоклаву на 121 °С у трајању од 15 минута и хлађења на 50 °С, додати антибиотике: триметоприм 0,06 г, налидиксилну киселину 0,002 г, амфотерицин Б 0,01 г киселина (Сигма) (оба 5 мг/мл), у 96% метанолу, амфотерицин Б (Сигма) (1мг/мл) у диметил сулфоксиду. Шток раствори се стерилишу филтрацијом.

Концентровани раствори антибиотика: триметоприм (Сигма) и налидиксилна киселина (Сигма) (оба 5 мг/мл), у 96%-тном метанолу, амфотерицин Б(Сигма) (1мг/мл) у диметилсулфоксиду.

Напомена:

Рок трајања основне хранљиве подлоге је три месеца. Након што се додају антибиотици, рок трајања је месец дана, и то уколико се припремљена подлога чува у фрижидеру.

2.2. NCP-88

Хранљиви (Difco) 23 г

Екстракт квасца (Difco) 2 г

Д-манитол 5 г

K₂HPO₄ 2 г

K₂HPO₄ 0,5 г

MgCO₄·7H₂O 0,25 г

Дестилована вода 1,0 Л

Растворите састојке, подесите рН на 7,2. Након стерилизације у аутоклаву(на 121 °С 15 минута) и хлађења на 50 °С, додајте следеће антибиотике:Полимиксин Б сулфат (Сигма) 0,003 г, налидиксилна киселина (Сигма) 0,008 г,циклохексимид (Сигма) 0,2 г.

Шток растворе антибиотика направити на следећи начин: растворити налидиксилну киселину у 0,01 М NaOH циклохексимид у 50% етанолу, полимиксин Б сулфат у дестилованој води. Основни раствори су стерилисани филтрирањем.

Напомена:

Рок трајања основне хранљиве подлоге је три месеца. Након што се додају антибиотици, рок трајања је месец дана, и то када се чува у фрижидеру.

Поглавље VIII

ПОТВРЂЕНИ И ОДОБРЕНИ ПРОТОКОЛИ И РЕАГЕНСИ ЗА PCR

Напомена:

Прелиминарна тестирања треба да омогуће поновљиву детекцију од најмање 10^3 до 10^4 ћелија *S.m. subsp. sepedonicus* по ml екстракта узорка.

Током прелиминарних тестирања не сме доћи до појаве лажно позитивних резултата код одабраних бактеријских изолата.

1. Протокол за мултиплекс PCR са унутрашњом PCR контролом (Пастрик, 2000)

1.1. Олигонуклеотидни прајмери

Узводни прајмер ПСА-1 5' - ctc ctt gtg ggg tgg gaa aa -3'

Низводни прајмер ПСА-Р 5' - tac tga gat gtt tca ctt ccc c -3'

Узводни прајмер НС-7-Ф 5' - gag gca ata aca ggt ctg tga tgc -3'

Низводни прајмер НС-8-Р 5' - tcc gca ggt tca cct acg ga -3'

Очекивана дужина умноженог производа из ДНК *S.m. subsp. sepedonicus* = 502 бп (пар прајмера ПСА).

Очекивана дужина умноженог производа из 18С рРНА унутрашње контроле = 377бп (пар прајмера НС).

1.2. PCR реакциони микс

Реагенс	Количина по реакцији	Коначна концентрација
Стерилна Ултра чиста вода	15,725 μ l	
10x PCR пуфер ¹ (15mM MgCl ₂)	2,5 μ l	1x (1,5mM MgCl ₂)
БСА (фракција В) (10%)	0,25 μ l	0,1%
Смеса д-НТП (20mM)	0,125 μ l	0,1 mM
Прајмер ПСА-1 (10 μ M)	0,5 μ l	0,2 μ M
Прајмер ПСА-Р (10 μ M)	0,5 μ l	0,2 μ M
Прајмер НС-7-Ф (10 μ M) ²	0,1 μ l	0,04 μ M
Прајмер НС-8-Р (10 μ M) ²	0,1 μ l	0,04 μ M
Таљ полимераза (5 У/ μ l) ¹	0,2 μ l	1,0 У

Запремина узорка 5,0 μ l

Укупна запремина 25,0 μ l

(1) валидација методе је извршена уз коришћење Таљ полимеразе Перкин Елмер (AmpliTaw или Gold) и Гибцо БРЛ.

(2) оптимизација концентрације прајмера HC-7Ф и HC-8-P је извршена за екстракцију из пупчаног конуса кромпира методом хомогенизације и пречишћавања ДНК према Пастрик (2000) (Поглавље II тачка б. подтачка б.1. и б.2). Уколико се користи екстракција трешењем или нека друга метода изолације ДНК, потребно је извршити поновну оптимизацију концентрације реагенаса.

1.3. Услови PCR реакције

Извести следећи програм:

- а) 1 циклус: 3 минута на 95 $^{\circ}$ C (денатурација ланца ДНК);
- б) 10 циклуса: 1 минут на 95 $^{\circ}$ C (денатурација ланца ДНК);
- в) 1 минут на 64 $^{\circ}$ C (везивање прајмера);
- г) 1 минут на 72 $^{\circ}$ C (хибридизација);
- д) 25 циклуса: 30 секунди на 95 $^{\circ}$ C (денатурација ланца ДНК);
- ђ) 30 секунди на 62 $^{\circ}$ C (денатурација ланца ДНК);
- е) 1 минут на 72 $^{\circ}$ C (продужавање копије);
- ж) циклус: 5 минута на 72 $^{\circ}$ C (коначно продужавање);
- з) држати на 4 $^{\circ}$ C.

Напомена:

Оптимальни услови коришћења овог програма су дефинисани за коришћење наPCR MJ Ресарцх ПТЦ 200 thermal cycler. Модификација трајања корака циклуса је вероватно потребна у случају употребе других модела thermal cycler-a.

1.4. Анализа продукта умножавања рестрикционим

ензимом

PCR производи умножени из ДНК *S.m. subsp. sepedonicus* испољавају карактеристичне полиморфизме у дужини рестрикционих фрагмената са ензимом Bgl II после инкубације на 37 $^{\circ}$ C 30 минута. Рестрикциони фрагменти добијени из специфичног фрагмента *S.m. subsp. sepedonicus* су величине 282 бп и 220бп.

2. Припрема боје за електрофорезу

2.1. Бромфенол плаво (10%-тни концентровани раствор)

Бромфенол плаво 5 г

Дестилована вода (бидестилована) 50 ml

2.2. Пуфер за бојење

Глицерол (86%) 3,5 ml

Бромфенол плаво (5.1) 300 μ l

Дестилована вода (бидестилована) 6,2 ml

3. 10x Трис ацетатни и ЕДТА пуфер (ТАЕ), рН 8,0

Трис пуфер 48 г

Глацијална сирћетна киселина 11,42 ml

ЕДТА (динатријумова со) 3,72 г

Дестилована вода 1,00 Л

Разредите 1x пре употребе.

(нпр. Инвитроген или замена)

Поглавље IX

ПОТВРЂЕНИ И ОДОБРЕНИ РЕАГЕНСИ

ЗА FISH ТЕСТ

1. Олиго-пробе

Специфична проба за *S.m. subsp. sepedonicus*

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

Неспецифична еубактеријска проба EUB-338-FITC: 5' - gct gcc tcc cgt agg agt -3'

2. Раствор за фиксирање

Раствор за фиксирање садржи параформалдехид који је токсичан. Носити рукавице и не удисати га. Препоручује се рад у дигестору.

а) загрејати 9 ml воде за употребу у процедурама молекуларне биологије(нпр. Ултра чисте воде) на око 60 °C и додати 0,4 g параформалдехида.Параформалдехид се раствара после додавања пет капи 1N NaOH и мешања на магнетној мешалици;

б) подесити рН на 7,0 додајући 1 ml 0,1M фосфатног пуфера (ПБ; рН 7,0) и 5 капи 1N HCl. Вредност рН проверити и помоћу индикатор трака и ако је потребно подесити рН помоћу HCl или NaOH.

У растворима са параформалдехидом не потребљавати пх метар;

в) профильтрирати раствор кроз мембрански филтер од 0,22 μm и до даље употребе чувати на 4 $^{\circ}\text{C}$ и заштитити од прашине.

Напомена:

Алтернативни раствор за фиксирање: 96%-тни етанол.

3. 3x Хубмих

NaCl 2,7 M

Трис-HCl 60mM (рН 7,4)

ЕДТА (филтер стерилисани у аутоклавима) 15 mM

Разредите до 1x према потреби

4. Раствор за хибридизацију

1x Хубмих

Натријум додецил сулфат (СДС) 0,01%

Проба ЕУБ 338 5 нг/ μl

Проба CMSCY301 5 нг/ μl

Припремити количине раствора за хибридизацију према прорачунима у Табели 1. Предложене количине за припремање смесе за хибридизацију (у даљем тексту: Табела 1).

За сваку плочицу (са 2 различита узорка у дупликату) треба 90 μl раствора за хибридизацију.

Табела 1.

	2 плочице	8 плочица
Стерилна ултра чиста вода	50,1	200,4
3x хубмих	30,0	120,0
1% СДС	0,9	3,6
Проба ЕУБ 338 (100 нг/ μl)	4,5	18,0
Проба CMSCY301 (100 нг/ μl)	4,5	18,0
Укупна запремина (μl)	90,0	360,0

Напомена:

Све растворе који садрже олиго-пробе осетљиве на светлост чувати у мраку на $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Током употребе заштитити их од директне сунчеве светлости или електричног светла.

5. 0,1М фосфатни пуфер, рН 7,0

Na_2HPO_4 8,52 г

KH_2PO_4 5,44 г

Дестилована вода

Растворити састојке, проверити рН и стерилисати у аутоклаву на 121°C 15 минута.

Поглавље X

ГАЈЕЊЕ ПЛАВОГ ПАТЛИЦАНА

Посејати семе плавог патлицана (*Соланум мелонгена*) у пастеризовани компост за семе. Пресајати сејанце са потпуно развијеним котиледонима (10 до 14 дана) у пастеризован компост у саксијама.

Плави патлицани би требало да се гаји у стакленику под следећим условима:

1) дужина дана: 14 сати или природна дужина дана, ако је дужа од 14 сати;

2) температура: дан: 21 до 24 $^{\circ}\text{C}$, ноћ: 15 $^{\circ}\text{C}$.

Осетљиве сорте плавог патлицана: „Black Beauty”, „Long Tom”, „Rima”, „Balsas” (веб страница [http //forum.europa.eu.int/Public /irc/sanco/Home/main](http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main)).

Поглавље XI

ПОСТУПАК БОЈЕЊА ПО ГРАМ-У

(ХУЦКЕРОВА МОДИФИКАЦИЈА) (DOETSCH, 1981)

а) Раствор кристал виолета

Растворите 2 г кристал виолета у 20 ml 95%-тног етанола.

Растворите 0,8 г амонијум-оксалата у 80 ml дестиловане воде.

Помешати два раствора.

б) Луголов раствор

Јод 1 г

Калијум-јодид 2 г

Дестилована вода 300 ml

Уситнити састојке користећи тучак и аван. Додати састојке води и промешати да се растворе у затвореној посуди.

в) Раствор шафранина за контраст

Основни раствор:

Шафранин О 2,5 g

95%-тни етанол 100 ml

Промешати и чувати.

Разредити: 1:10 за добијање радног раствора.

Поступак бојења:

1. Припремити размазе, осушити на ваздуху и фиксирати их загревањем.
2. Плочицу прелити раствором кристал виолета и држати један минут.
3. Кратко испрати текућом водом.
4. Прелити Луголовим раствором један минут.
5. Испрати текућом водом и просушити филтер-папиром.
6. Боју уклонити 95%-тним етанолом, који се додаје кап по кап или се размаз урони на 30 секунди и лагано протресе.
7. Испрати текућом водом и просушити филтер-папиром.
8. Прелити раствором шафранина 10 секунди.
9. Испрати текућом водом и осушити филтер-папиром.

Грам позитивне бактерије се боје љубичасто-плаво; грам негативне бактерије се боје ружичасто-црвено.