

## I

(Akty, których publikacja jest obowiązkowa)

**DYREKTYWA KOMISJI 2006/56/WE****z dnia 12 czerwca 2006 r.****zmieniająca załączniki do dyrektywy Rady 93/85/EWG w sprawie zwalczania bakteriozy pierścieniowej ziemniaka**

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

uwzględniając Traktat ustanawiający Wspólnotę Europejską,

uwzględniając dyrektywę Rady 93/85/EWG z dnia 4 października 1993 r. <sup>(1)</sup> w sprawie zwalczania bakteriozy pierścieniowej ziemniaka, w szczególności jej art. 12,

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) Jednym z ważnych organizmów szkodliwych dla ziemniaka jest *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis *et al.* ssp. *sepedonicus* (Spieckermann *et* Kotthoff) Davis *et al.*, czynnik chorobotwórczy powodujący bakteriozę pierścieniową ziemniaka (zwany dalej „organizmem”).
- (2) Organizm ten nadal występuje w niektórych rejonach Wspólnoty.
- (3) Dyrektywa Rady 93/85/EWG ustaliła szczegółowe środki, które mają zostać podjęte w państwach członkowskich dla zlokalizowania organizmu i ustalenia jego zasięgu występowania; zapobieżenia jego wystąpieniu i rozprzestrzenianiu się; oraz, w przypadku jego wykrycia, w celu zapobieżenia jego rozprzestrzenianiu się i zwalczania mającego na celu jego zniszczenie.
- (4) Od tamtego czasu nastąpił znaczący rozwój wiedzy o biologii i o procedurach wykrywania i identyfikacji organizmu; co więcej, doświadczenie praktyczne zdobyte przy zwalczaniu organizmu sprawia, że konieczna jest rewizja kilku technicznych ustaleń, mających związek ze środkami zwalczania.
- (5) W tej sytuacji wydaje się, że konieczny jest przegląd i aktualizacja środków, których opis zawarto w załącznikach do dyrektywy 93/85/EWG.

- (6) Jeśli chodzi o procedury wykrywania i identyfikacji, ujęto tu zarówno ostatnio opracowane metody, takie jak fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH), czy łańcuchowa reakcja polimerazy, jak i udoskonalenia różnych elementów technicznych procedury wykrywania i identyfikacji stosowanej dotychczasowo.
- (7) Jeśli chodzi o techniczne elementy środków zwalczania choroby, poprawiono ustalenia co do: sposobu konserwacji badanych prób, aby móc śledzić drogę organizmu, elementów potrzebnych do stwierdzenia zasięgu prawdopodobnego porażenia, szczegółów powiadamiania o wszelkich potwierdzonych przypadkach występowania organizmu i odpowiedniej strefie porażenia, środków, które należy wprowadzić w miejscach produkcji określonych jako porażone, a znajdujących się w obrębie wyznaczonych stref.
- (8) Środki przewidziane w niniejszej dyrektywie są zgodne z opinią Stałego Komitetu ds. Zdrowia Roślin,

PRZYJMUJE NINIEJSZĄ DYREKTYWĘ:

*Artykuł 1*

Załączniki do dyrektywy 93/85/EWG zostają niniejszym zastąpione odpowiednimi tekstami zawartymi w Załączniku do niniejszej dyrektywy.

*Artykuł 2*

1. Państwa członkowskie przyjmują i publikują, najpóźniej do dnia 31 marca 2007 r., przepisy ustawowe, wykonawcze i administracyjne niezbędne do wykonania niniejszej dyrektywy. Państwa członkowskie niezwłocznie przekazują Komisji teksty tych przepisów oraz tabelę korelacji między tymi przepisami i niniejszą dyrektywą.

Państwa Członkowskie stosują wspomniane przepisy od dnia 1 kwietnia 2007 r.

Przepisy przyjęte przez państwa członkowskie zawierają odniesienie do niniejszej dyrektywy lub odniesienie takie towarzyszy ich urzędowej publikacji. Sposób dokonania takiego odniesienia ustalany jest przez państwa członkowskie.

<sup>(1)</sup> Dz.U. L 259 z 18.10.1993, str. 2.

2. Państwa członkowskie niezwłocznie przekażą Komisji tekst podstawowych przepisów prawa krajowego, przyjętych w dziedzinach objętych niniejszą dyrektywą.

*Artykuł 4*

Niniejsza dyrektywa skierowana jest do państw członkowskich.

*Artykuł 3*

Sporządzono w Brukseli, dnia 12 czerwca 2006 r.

Niniejsza dyrektywa wchodzi w życie trzeciego dnia po jej opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Unii Europejskiej*.

*W imieniu Komisji*  
Markos KYPRIANOU  
Członek Komisji

## ZAŁĄCZNIK I

**SCHEMAT BADANIA DIAGNOSTYCZNEGO WYKRYWANIA I IDENTYFIKACJI BAKTERIOZY PIERŚCIENIOWEJ ZIEMNIAKA, *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* (Smith) Davis *et al.* ssp. *SEPEDONICUS* (Spieckermann *et Kottthoff*) Davis *et al.*****ZAKRES SCHEMATU TESTÓW**

Przedstawiany schemat obejmuje różne procedury związane z:

- i) diagnozą bakteriozy pierścieniowej w bulwach ziemniaka i roślinach;
- ii) wykrywaniem *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* w próbach bulw ziemniaka i roślinach;
- iii) identyfikacją *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*C. m.* subsp. *sepedonicus*).

**ZASADY OGÓLNE**

Zoptymalizowane protokoły dla różnych metod, zatwierdzone odczynniki i szczegóły przygotowania materiałów testowych i kontrolnych zamieszczono w dodatkach. Lista laboratoriów, które brały udział w optymalizacji i zatwierdzaniu protokołów, została przedstawiona w dodatku 1.

Ponieważ protokoły obejmują wykrywanie organizmów poddawanych kwarantannie i będą obejmować wykorzystanie żywych kultur *C. m.* subsp. *sepedonicus* jako materiałów kontrolnych, konieczne będzie prowadzenie działań we właściwych warunkach kwarantanny, z odpowiednimi instalacjami usuwania odpadów i pod warunkiem posiadania odpowiednich licencji, wydawanych przez urzędowe instytucje odpowiedzialne za kwarantannę roślin.

Parametry testów muszą zapewniać spójne i powtarzalne wykrywanie poziomu *C. m.* subsp. *sepedonicus* przy ustalonych progach czułości wybranych metod.

Konieczne jest dokładne przygotowanie kontroli pozytywnych.

Przeprowadzanie testów stosownie do wymaganych progów oznacza także właściwe warunki w miejscu przeprowadzania badań, konserwację i kalibrację sprzętu, ostrożne przechowywanie i obchodzenie się z odczynnikami i wszelkie środki mające zapobiec kontaminacji między próbkami, np. oddzielanie kontroli dodatnich od próbek testowych. Muszą być stosowane normy kontroli jakości, aby uniknąć błędów administracyjnych i innych, zwłaszcza dotyczących etykietowania i dokumentacji.

Podejrzewane wystąpienie, jak określono w art. 4 ust. 2 dyrektywy 93/85/EWG, oznacza wynik dodatni w testach diagnostycznych lub przesiewowych, przeprowadzanych na próbce zgodnie z tym, co przedstawiono w schematach blokowych.

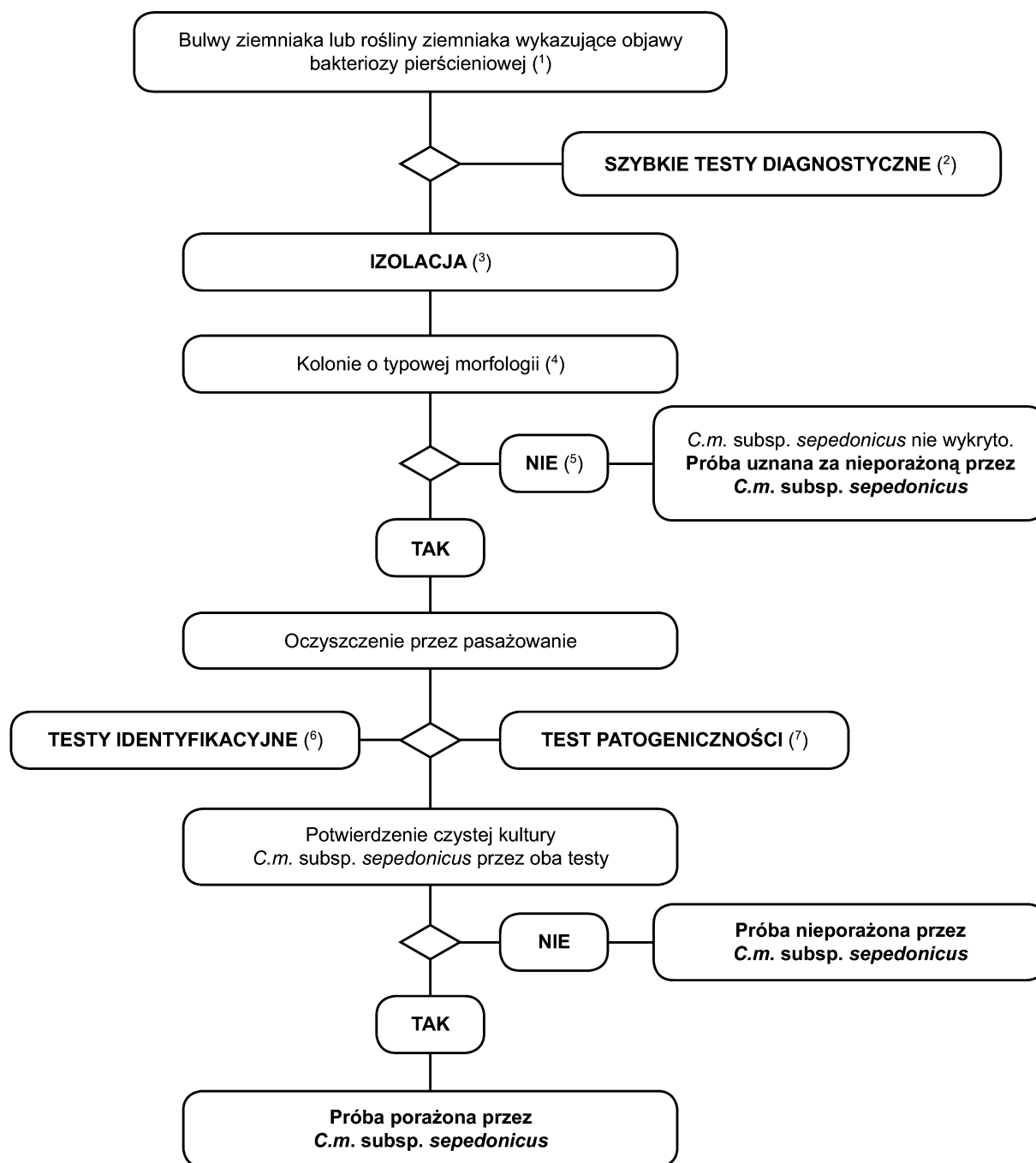
Jeśli pierwszy test przesiewowy (IF lub PCR/FISH) jest dodatni, to podejrzewa się porażenie *Cms* i należy przeprowadzić drugi test przesiewowy. Jeśli drugi test przesiewowy jest dodatni, to podejrzenie zostaje potwierdzone (podejrzewane wystąpienie) i procedura musi być kontynuowana zgodnie ze schematem. Jeśli drugi test przesiewowy jest ujemny, uznaje się, że próba nie jest porażona *Cms*.

Tak więc dodatni wynik testu IF, jak określono w art. 4 ust. 2, jest wyznaczony przez dodatni odczyt IF, potwierdzony przez drugi test przesiewowy (PCR/FISH).

Zgodnie z treścią art. 5 ust. 1 dyrektywy 93/85/EWG potwierdzona obecność pociąga za sobą konieczność izolacji i identyfikacji czystej kultury *C. m.* subsp. *sepedonicus* z potwierdzeniem patogenności.

**1. SCHEMAT BLOKOWY****1.1. Schemat wykrywania w przypadku diagnozowania bakteriozy pierścieniowej w bulwach ziemniaka i w roślinach ziemniaka na podstawie objawów bakteriozy pierścieniowej**

Procedura testowa jest przeznaczona dla bulw ziemniaka i całych roślin z typowymi lub podejrzewanymi objawami bakteriozy pierścieniowej. Obejmuje szybki test przesiewowy, izolację czynnika chorobotwórczego z zainfekowanej tkanki przewodzącej na podłoże diagnostyczne i w przypadku dodatniego wyniku — identyfikację kultury jako *C. m.* subsp. *sepedonicus*.



(1) Opis objawów zamieszczono w części 2.

(2) Właściwymi testami są:  
— Test IF (część 4),  
— Test PCR (część 6),  
— Test FISH (część 5).

(3) Mimo że izolacja czynnika chorobotwórczego z materiału roślinnego z typowymi objawami przy zastosowaniu techniki rozcieńczeń płytkowych jest prosta, hodowla z zaawansowanych stadiów infekcji może się nie udać. Bakterie saprofityczne, które rosną na chorej tkance, mogą przytłumić lub zahamować wzrost czynnika chorobotwórczego na podłożu do izolacji. Wobec tego zaleca się stosować zarówno selektywne, jak i nieselektywne podłoża, najlepiej MTNA (część 8) lub test biologiczny (część 7).

(4) Opis morfologii typowej kolonii zamieszczono w części 8.

(5) Jeśli test izolacji jest ujemny, ale objawy choroby są typowe, należy powtórzyć izolację.

(6) Wiarygodna identyfikacja czystej kultury *C.m. subsp. sepedonicus* uzyskiwana jest przy użyciu testów wymienionych w części 9.

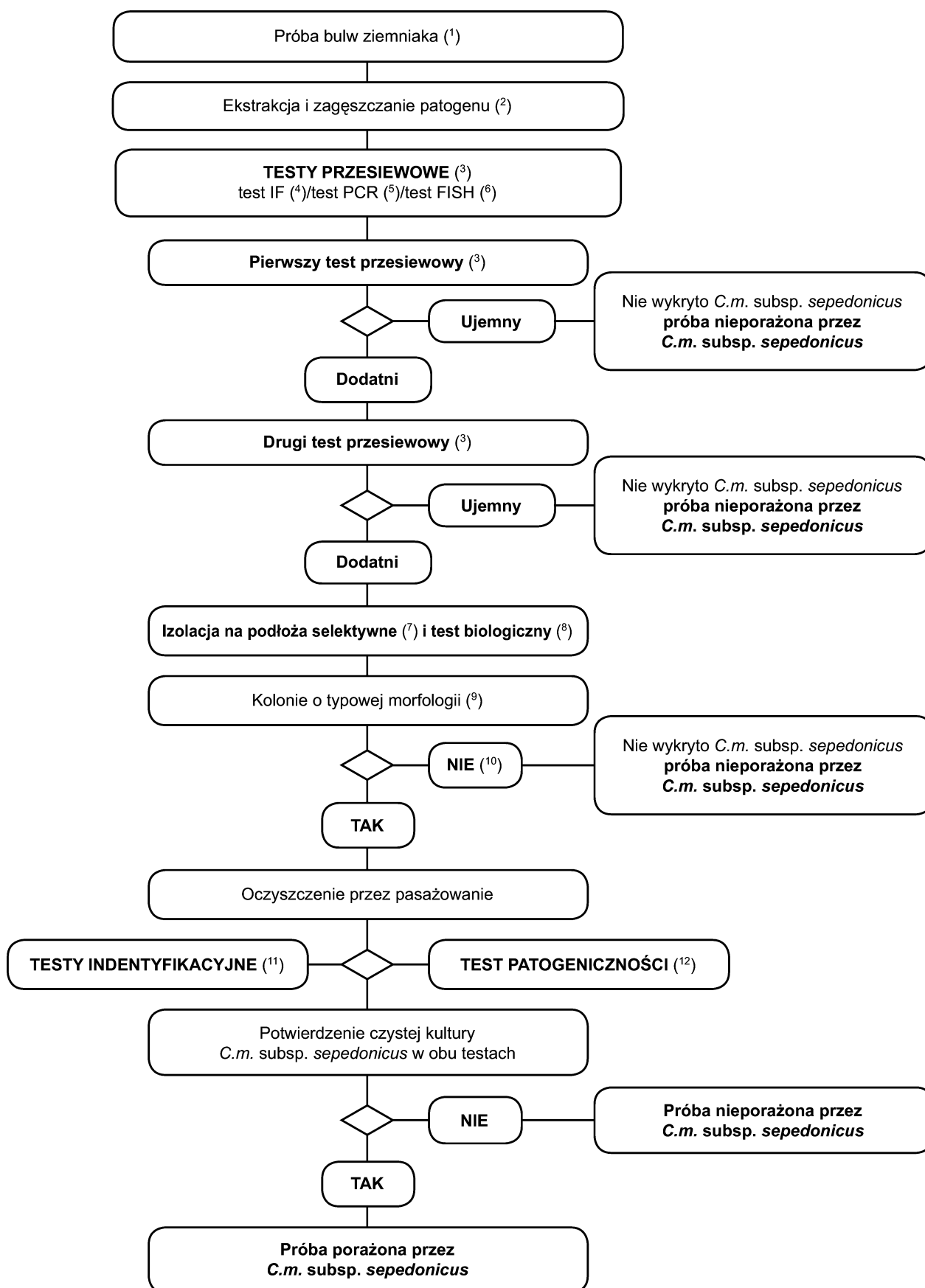
(7) Test patogeniczności opisano w części 10.

1.2. **Schemat wykrywania i identyfikacji *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* w próbach bulw ziemniaka niewykazujących objawów**

*Zasada*

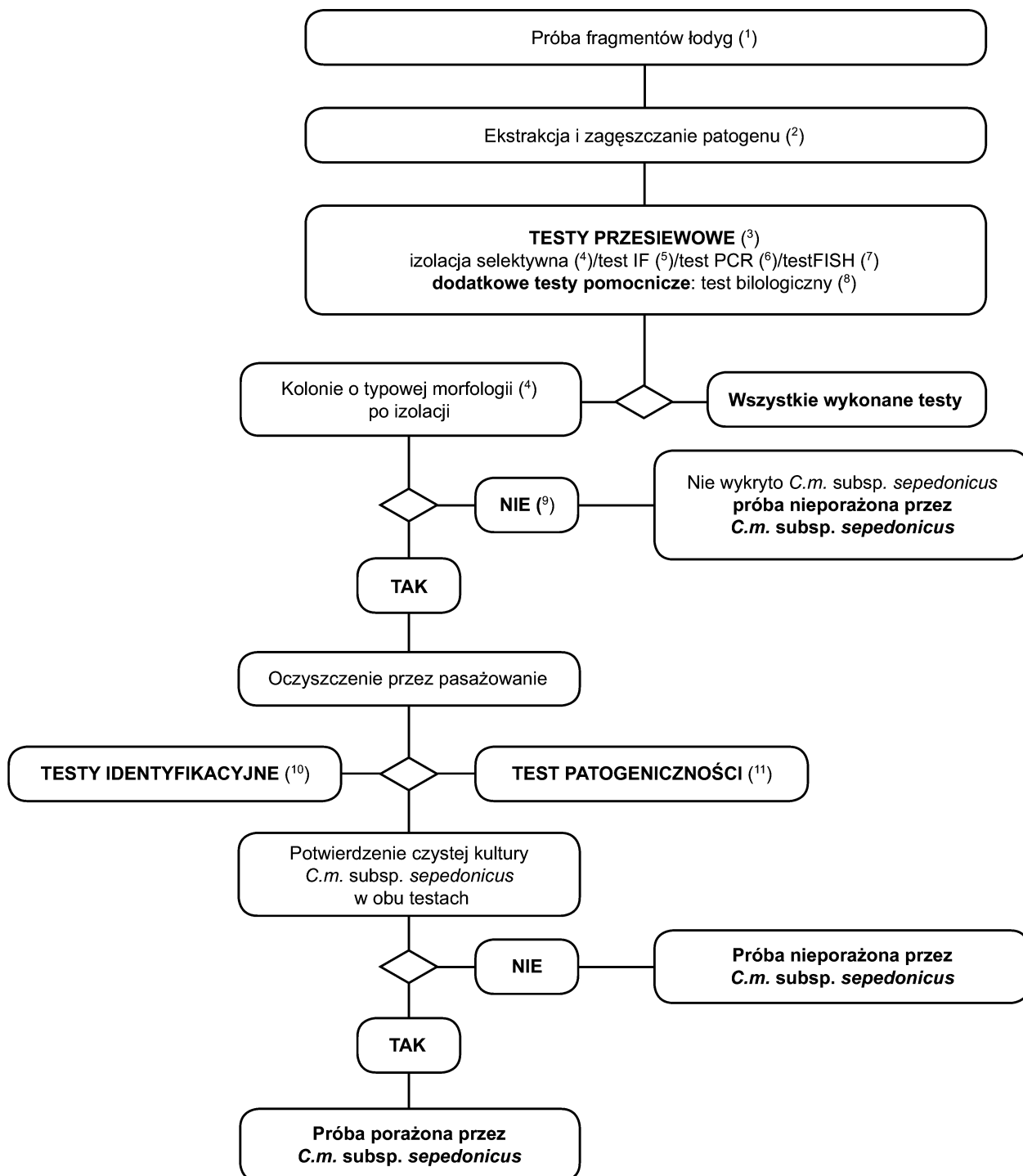
Procedura testowa jest przeznaczona do wykrywania utajonych infekcji w bulwach ziemniaka. Dodatni wynik w przynajmniej dwóch testach przesiewowych, opartych na różnych zasadach biologicznych, musi być uzupełniony o izolację czynnika chorobotwórczego; a następnie, w przypadku izolacji typowych kolonii, o potwierdzenie czystej kultury jako *C. m. subsp. sepedonicus*. Dodatni wynik z jednego tylko testu przesiewowego nie wystarcza, aby uznać próbę za podejrzaną.

Testy przesiewowe i testy izolacji muszą umożliwiać wykrycie od  $10^3$  do  $10^4$  komórek/ml zawiesiny kontroli pozytywnej włączonej do każdej serii testów.



- (<sup>1</sup>) Standardowa wielkość próbki wynosi 200 bulw, chociaż procedura może być stosowana do mniejszych prób, jeśli 200 bulw nie jest dostępnych.
- (<sup>2</sup>) Metody ekstrakcji czynnika chorobotwórczego i metody jego zagęszczania zostały opisane w części 3.1.
- (<sup>3</sup>) Jeśli co najmniej dwa testy oparte na różnych zasadach biologicznych dają dodatnie wyniki, należy przeprowadzić izolację i potwierdzenie. Wykonać co najmniej jeden test przesiewowy. Gdy test daje wynik ujemny, próba zostaje uznana za ujemną. W przypadku gdy test daje wynik dodatni, należy przeprowadzić drugi lub kolejne testy przesiewowe wykorzystujące różne zasady biologiczne w celu zweryfikowania pierwszego wyniku dodatniego. Jeśli drugi lub kolejne testy dają wyniki ujemne, próba jest uznawana za ujemną. Dalsze testy nie są potrzebne.
- (<sup>4</sup>) Test immunofluorescencyjny (IF).  
Do testów przesiewowych IF należy zawsze stosować przeciwciała poliklonalne, dodatkowe przeciwciała monoklonalne mogą zapewnić większą specyficzność (patrz: część 4).
- (<sup>5</sup>) Test PCR.  
Stosować odpowiednio zatwierdzone odczynniki i procedury PCR (patrz: część 6).
- (<sup>6</sup>) Test FISH.  
Stosować odpowiednio zatwierdzone odczynniki i procedury (patrz: część 5).
- (<sup>7</sup>) Selektywna izolacja.  
Zastosowanie podłoża MTNA lub NCP-88 oraz rozcieńczenia 1/100 zawiesiny to w wielu przypadkach właściwa metoda bezpośredniej izolacji *C. m. subsp. sepedonicus*. Typowe kolonie można otrzymać po 3–10 dniach od posiewu. Czynniki chorobotwórczy może być następnie oczyszczony i zidentyfikowany. Pełne wykorzystanie potencjału testu wymaga starannego przygotowania fragmentów tkanki przewodzącej z części przystolonowej bulwy, aby uniknąć obecności w pożywce wtórnych bakterii związanych z bulwą ziemniaka, które konkurują z *C. m. subsp. sepedonicus* na podłożu i mogą przytłumić czynnik chorobotwórczy. Jeśli zawiedzie test płytkowy, konieczne jest wykonanie izolacji z roślin użytych do testu biologicznego (patrz: część 8).
- (<sup>8</sup>) Test biologiczny jest stosowany w celu izolacji *C. m. subsp. sepedonicus* z ekstraktu osadu ziemniaka przez selektywne namnożenie w roślinach ooberżyny (*Solanum melongena*). Test wymaga optymalnych warunków inkubacji, zgodnie z opisem metody. Bakterie hamujące rozwój *C. m. subsp. sepedonicus* na podłożu MTNA lub NCP-88 najprawdopodobniej nie będą zakłócać tego testu. (patrz: część 7).
- (<sup>9</sup>) Morfologia typowej kolonii została opisana w części 8.
- (<sup>10</sup>) Hodowla lub testy biologiczne mogą nie dostarczyć oczekiwanych wyników z powodu konkurencji lub inhibicyjnego działania bakterii saprofitycznych. Jeśli w testach przesiewowych uzyskano wyniki dodatnie, ale testy izolacji są ujemne, należy powtórzyć testy izolacji z tego samego osadu lub pobierając dodatkową tkankę przewodzącą w pobliżu części przystolonowej przekrojonych bulw pochodzących z tej samej próby oraz jeśli to konieczne, poddać testom dodatkowe próby.
- (<sup>11</sup>) Wiarygodną identyfikację czystych przypuszczalnie kultur *C. m. subsp. sepedonicus* osiąga się dzięki testom opisanym w części 9.
- (<sup>12</sup>) Test patogeniczności opisano w części 10.

- 1.3. Schemat wykrywania i identyfikacji *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* w próbach roślin ziemniaka niewykazujących objawów





- (<sup>1</sup>) Zalecane wielkości prób podano w części 3.2.
- (<sup>2</sup>) Metody ekstrakcji czynnika chorobotwórczego i metody jego zagęszczania zostały opisane w części 3.2.
- (<sup>3</sup>) Jeśli co najmniej dwa testy oparte na różnych zasadach biologicznych dają dodatnie wyniki, należy przeprowadzić izolację i potwierdzenie.  
Wykonać co najmniej jeden test przesiewowy. Gdy test ten daje wynik ujemny, próba zostaje uznana za ujemną. W przypadku gdy test ten daje wynik dodatni, należy przeprowadzić drugi lub kolejne testy wykorzystujące różne zasady biologiczne w celu zweryfikowania pierwszego dodatniego wyniku. Jeśli drugi lub kolejne testy dają wyniki ujemne, próba jest uznawana za ujemną. Dalsze testy nie są potrzebne.
- (<sup>4</sup>) Test izolacji na podłoża selektywne i typowa morfologia kolonii zostały opisane w części 8.
- (<sup>5</sup>) Test IF opisano w części 4.
- (<sup>6</sup>) Testy PCR opisano w części 6.
- (<sup>7</sup>) Test FISH opisano w części 5.
- (<sup>8</sup>) Test biologiczny opisano w części 7.
- (<sup>9</sup>) Hodowla lub testy biologiczne mogą nie dostarczyć oczekiwanych wyników z powodu konkurencji lub inhibicyjnego działania bakterii saprofitycznych. Jeśli w testach przesiewowych uzyskano wyniki dodatnie, ale testy izolacji są ujemne, należy powtórzyć testy izolacji i – jeśli to konieczne – poddać testom dodatkowe próby.
- (<sup>10</sup>) Wiarygodną identyfikację czystych kultur przypuszczalnie *C. m. subsp. sepedonicus* osiąga się dzięki testom opisanym w części 9.
- (<sup>11</sup>) Test patogeniczności opisano w części 10.

## 2. BADANIE WIZUALNE OBJAWÓW BAKTERIOZY PIERŚCIENIOWEJ

### 2.1. Rośliny ziemniaka

W europejskich warunkach klimatycznych objawy są rzadko stwierdzane na polu i często jedynie na końcu sezonu. Co więcej, objawy są często zamaskowane przez inne choroby lub mylone z innymi chorobami, starzeniem się i uszkodzeniami mechanicznymi. Tak więc w czasie kontroli w terenie łatwo przeoczyć objawy. Objawy więdnienia bardzo się różnią od objawów więdnienia w przypadku śluzaka; więdnienie zazwyczaj następuje powoli i początkowo ograniczone jest do krawędzi liści. Zainfekowane młode liście często nadal rosną, choć wolniej w rejonach zainfekowanych. Sprawia to, że liście przyjmują dziwaczne kształty. Liście dotknięte niedrożnością tkanek przewodzących w dolnej części łodygi często mają żółte do pomarańczowych chlorotyczne plamy między żyłkami. Zainfekowane listki, liście, a nawet łodygi mogą w końcu obumrzeć. Często liście i bulwy są po prostu mniejsze. Czasem rośliny są skarłowaciałe. Kolorowe ilustracje różnych objawów można obejrzeć na stronie internetowej <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

### 2.2. Bulwy ziemniaka

Do najwcześniejszych objawów, obserwowanych szczególnie w pobliżu części przystolonowych bulwy, należą nieznaczna szklistość lub przejrzystość tkanek, bez rozmiękczenia wokół wiązek przewodzących. Pierścień wiązek przewodzących w części przystolonowej może być nieco ciemniejszy niż zazwyczaj. Pierwszym łatwym do rozpoznania objawem jest przebarwienie pierścienia wiązek przewodzących na żółtawo. Po lekkim ściśnięciu bulwy z naczyń wydostają się „słupki” serowatej masy. Wyciek ten zawiera miliony bakterii. W tym stadium można obserwować brązowienie wiązek przewodzących, a objawy obserwowane w bulwach mogą przypominać objawy śluzaka, choroby powodowanej przez *Ralstonia solanacearum*. Początkowo objawy te mogą być ograniczone do jednej części pierścienia, niekoniecznie w pobliżu części przystolonowej, i mogą się rozszerzać stopniowo na cały pierścień. W miarę rozprzestrzeniania się infekcji dochodzi do zniszczenia wiązek przewodzących; kora zewnętrzna może oddzielać się od wewnętrznej. W zaawansowanym stadium infekcji na powierzchni bulwy pojawiają się spęknięcia, które często mają czerwonawo-brązowe brzegi. Ostatnio w Europie obserwowano przypadki, w których centralna część kory gniła jednocześnie z pierścieniami wiązek przewodzących, co w rezultacie prowadziło do wtórnej inwazji z objawami wygniwania tkanek i nekrozy. Wtórna infekcja bakteryjna czy grzybowa może maskować objawy i dlatego odróżnienie zaawansowanego stadium infekcji bakteriozy pierścieniowej od innych zgnilizn może być trudne, a nawet niemożliwe. Możliwe są objawy nietypowe. Kolorowe ilustracje różnych objawów można obejrzeć na stronie internetowej <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

## 3. PRZYGOTOWANIE PRÓB

### 3.1. Bulwy ziemniaka

Uwaga:

- Standardowa wielkość próby wynosi 200 bulw. Bardziej intensywne badania wymagają większej ilości testów na próbach tej wielkości. Większa liczba bulw w próbie będzie uniemożliwiać lub utrudniać interpretację wyników. Jednak gdy dostępna jest mniejsza niż 200 liczba bulw, procedurę tę można stosować z powodzeniem.
- Zatwierdzenie wszystkich opisanych niżej metod wykrywania oparte było na testowaniu prób złożonych z 200 bulw.
- Opisany poniżej ekstrakt z ziemniaków może być także wykorzystany do wykrywania bakterii śluzaka, *Ralstonia solanacearum*.

Opcjonalna procedura wstępna, poprzedzająca przygotowanie próby:

Umyć bulwy. Między kolejnymi próbami używać odpowiednich środków dezynfekujących (związków chloru, jeśli ma zostać przeprowadzony test PCR, aby całkowicie usunąć DNA czynnika chorobotwórczego), i detergentów. Wysuszyć bulwy na powietrzu. Ta procedura mycia jest szczególnie użyteczna (lecz niewymagana) w przypadku prób z nadmierną ilością ziemi i jeśli mają być stosowane test PCR lub metoda bezpośredniej izolacji.

- 3.1.1. Za pomocą czystego i zdezynfekowanego skalpela lub noża do warzyw zdjąć skórkę z części przystolonowej każdej bulwy tak, aby stała się widoczna tkanka naczyniowa. Należy starannie wyciąć niewielki stożek tkanki przewodzącej z części przystolonowej i zostawić jak najmniejszą ilość innych tkanek (patrz: strona internetowa: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>)

Uwaga:

Odłożyć na bok wszystkie bulwy z podejrzeniem objawów bakteriozy pierścieniowej i testować je oddzielnie.

Jeżeli w czasie pobierania tkanki przystolonowej obserwuje się objawy nasuwające podejrzenie bakteriozy pierścieniowej, należy przeprowadzić wzrokowe badanie bulwy po przecięciu jej w pobliżu części przystolonowej. Każda przecięta bulwa z podejrzanymi objawami musi być poddana korkowaceni w temperaturze pokojowej przez 2 dni oraz przechowywana w warunkach odizolowania (w temperaturze 4–10 °C) aż do chwili ukończenia wszystkich testów. Wszystkie bulwy danej próby (w tym bulwy podejrzane) powinny być przechowywane zgodnie z zasadami określonymi w załączniku II.

- 3.1.2. Fragmenty części przystolonowych umieścić w nieużywanych wcześniej pojemnikach jednorazowego użytku, które można szczelnie zamknąć (w przypadku powtórnego użycia pojemników należy je starannie oczyścić i zdezynfekować przy użyciu związków chloru). Pobrane fragmenty części przystolonowych najlepiej poddać obróbce niezwłocznie. Jeśli nie jest to możliwe, przechowywać je w pojemniku, nie dodając buforu, nie dłużej niż 72 godziny w lodówce, zaś w temperaturze pokojowej nie dłużej niż 24 godziny. Wysuszenie i korkowacenie rdzeni oraz rozwój saprofitów w czasie przechowywania mogą utrudnić wykrywanie bakterii powodujących bakteriozę pierścieniową.
- 3.1.3. Z pobranymi fragmentami części przystolonowych postępować według jednej z następujących procedur:
- a) Fragmenty tkanki przystolonowej pokryć dostateczną objętością (około 40 ml) buforu do ekstrakcji (dodatek 3) i mieszać na wytrząsarce obrotowej (50–100 obr./min) przez 4 godziny, utrzymując temperaturę poniżej 24 °C lub przez 16–24 godzin w lodówce;
- lub
- b) Fragmenty tkanki przystolonowej homogenizować z odpowiednią ilością (około 40 ml) buforu do ekstrakcji (dodatek 3) albo z użyciem miksera (np. Waring lub Ultra Thurax), albo przez rozdrabnianie w szczelnie zamkniętej jednorazowej torebce do maceracji (np. Stomacher lub Bioreba z polietylenu o dużej wytrzymałości, 150 mm × 250 mm; sterylizowane promieniowaniem), używając gumowego młotka lub odpowiedniego aparatu do rozdrabniania (np. Homex).

**Uwaga:**

Jeśli próby są homogenizowane przy użyciu miksera, ryzyko kontaminacji między próbami jest znaczne. Należy podjąć odpowiednie środki ostrożności, aby nie dopuścić do powstania aerozolu lub rozlania w czasie procesu ekstrakcji. Należy się upewnić, że do każdej próby używane są świeżo wysterylizowane ostrza i naczynia miksera. Jeśli ma być stosowany test PCR, unikać przeniesienia DNA na pojemniki lub aparaty do rozdrabniania. Jeśli ma być zastosowany test PCR, zleca się rozdrabnianie w torebkach i stosowanie jednorazowych probówek.

- 3.1.4. Zdekantować supernatant. Jeśli jest zbyt mętny, sklarować — albo przez odwirowanie przy niskiej liczbie obrotów (przy nie więcej niż 180 g przez 10 minut w temperaturze 4–10 °C), albo przez filtrację w próżni (40–100 µm), myjąc filtr dodatkowym (10 ml) buforem do ekstrakcji (dodatek 3).
- 3.1.5. Zagęścić frakcję bakterii przez odwirowanie przy 7 000 g przez 15 minut (lub 10 000 g przez 10 minut) w temperaturze 4–10 °C i odrzucić supernatant bez naruszania osadu.
- 3.1.6. Zawiesić powtórnie osad w 1,5 ml buforu do zawieszania osadu (dodatek 3). Stosować 500 µl w badaniach na obecność *C. m. subsp. sepedonicus*, 500 µl w badaniach na obecność *Ralstonia solanacearum* i 500 µl do celów porównawczych. Dodać sterylną glicerynę aż do uzyskania ostatecznego stężenia 10–25 % (obj./obj.) i dodać do 500 µl zawiesiny porównawczej i do pozostałej zawiesiny testowej, zworteksować i przechowywać w temperaturze od –16 do –24 °C (tygodnie) lub od –68 do –86 °C (miesiące). W czasie wykonywania testu przechowywać zawiesiny testowe w temp. 4–10 °C.

Wielokrotne zamrażanie i rozmrażanie nie jest wskazane.

Jeśli konieczny jest transport ekstraktu, zapewnić dostawę w przenośnej lodówce w ciągu 24 lub 48 godzin.

- 3.1.7. Jest niezwykle ważne, aby w celu uniknięcia kontaminacji wszystkie kontrole pozytywne *C. m. subsp. sepedonicus* i próby badać osobno. Odnosi się to zarówno do szkiełek IF, jak i do wszystkich testów.

## 3.2. Rośliny ziemniaka

**Uwaga:**

Do wykrywania utajonych populacji *C. m. subsp. sepedonicus* zaleca się stosowanie testów prób złożonych. Procedurę można bez problemów stosować do prób nieprzekraczających 200 części łodyg. (Jeśli przeprowadzane są badania statystyczne, należy się oprzeć na statystycznie reprezentatywnej próbie badanej populacji roślin).

- 3.2.1. Za pomocą zdezynfekowanego noża lub sekatora wyciąć 1–2-centymetrowy fragment łodygi tuż ponad powierzchnią gruntu.

Przez krótką chwilę dezynfekować fragmenty łydgi 70-procentowym etanolem i natychmiast osuszyć je bibułą.

Umieścić segmenty łydgi w zamkniętym, sterylnym pojemniku, stosując się do następujących procedur pobierania prób:

3.2.2. Poddać fragmenty łydgi jednej z następujących procedur:

a) Pokryć odcinki łydgi dostateczną objętością (około 40 ml) buforu ekstrakcyjnego (dodatek 3) i mieszać na wyrzășarce obrotowej (50–100 obr./min) przez 4 godziny w temperaturze poniŹej 24 °C lub przez 16–24 godziny w lodówce;

lub

b) Rozpocząć procedurę bezzwłocznie, miaŹdŹąc odcinki łydgi w mocnej torebce do maceracji (np. Stomacher lub Bioreba) z odpowiednią iloœcią buforu ekstrakcyjnego (dodatek 3), uŹywając gumowego młotka lub odpowiedniego urzĂdzenia do rozdrabniania (np. Homex). Jeœli nie jest to moŹliwe, przechowywać odcinki łydgy nie dłuŹej niŹ 72 godziny w lodówce lub nie dłuŹej niŹ 24 godziny w temperaturze pokojowej.

3.2.3. Zdekantować supernatant po ustaleniu się przez 15 minut.

3.2.4. Dalsze klaryfikowanie ekstraktu lub zagęszczanie frakcji bakteryjnej zwykle nie jest wymagane, ale moŹna je osiĂgnąć przez filtrację i/lub odwirowanie, jak opisano w częœciach 3.1.4–3.1.6.

3.2.5. Podzielić czysty lub stęŹony ekstrakt z próby na dwie równe częœci. W czasie przeprowadzania testu jednĂ połowę trzymać w temperaturze 4–10 °C, a drugĂ połowę — z 10–25 % (obj./obj.) sterylnego glicerolu przechowywać w temperaturze – 16 do – 24 °C (tygodnie) lub w – 68 do – 86 °C (miesiĂce), jeœli wymagane sĂ dalsze testy.

#### 4. TEST IF

##### Zasada

Stosowanie testu IF jako głównego testu przesiewowego jest zalecane z uwagi na wykazaną zdolnoœć osiĂgania wymaganych progów wykrywalnoœci.

Kiedy test IF jest stosowany jako główny test przesiewowy, a wynik IF jest dodatni, konieczne jest zastosowanie testu PCR lub FISH jako drugiego testu przesiewowego. Kiedy test IF jest stosowany jako drugi test przesiewowy, a odczyt IF jest dodatni, do zakończnienia analizy wymagane jest przeprowadzanie dalszych testów, zgodnie ze schematem blokowym.

##### Uwaga:

Zawsze wtedy, kiedy test IF jest stosowany jako główny test przesiewowy, stosować przeciwiĂcia poliklonalne. W przypadku pozytywnego wyniku IF z przeciwiĂciem poliklonalnym dalsze badanie próby przy uŹyciu przeciwiĂcia monoklonalnego moŹe zapewnić większą specyficznoœć, ale moŹe być mniej czułe.

UŹywać przeciwiĂcia do szczepu porównawczego *C. m. subsp. sepedonicus*. Zaleca się, aby dla kaŹdej nowej partii przeciwiĂcia okreœlać miano. Miano jest okreœlane jako największe rozcieńczenie, przy którym zachodzi optymalna reakcja w czasie testowania zawiesiny od 10<sup>5</sup> do 10<sup>6</sup> komórek na ml homologicznego szczepu *C. m. subsp. sepedonicus* i przy uŹyciu odpowiedniego koniugatu izotiocyanianu fluoresceiny (FITC), zgodnie z zaleceniami producenta. StęŹone przeciwiĂcia poliklonalne lub monoklonalne powinny mieć miano IF przynajmniej 1:2000. W czasie przeprowadzania testu przeciwiĂcia powinny być stosowane przy stęŹeniu roboczym (WD) bliskim lub równym mianu. Stosować zatwierdzone przeciwiĂcia (patrz: strona internetowa <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Test powinien być przeprowadzany na œwieŹo przygotowanych ekstraktach z prób. Jeœli to konieczne, moŹe być z powodzeniem przeprowadzany na ekstraktach przechowywanych w temperaturze od – 68 do – 86 °C w glicerolu. Glicerol moŹe być usunięty z próby przez dodanie 1 ml buforu do zawieszania osadu (dodatek 4), powtórne odwirowanie przez 15 minut przy 7 000 g i powtórne zawieszenie w takiej samej objętoœci buforu do zawieszania osadu. Częœto nie jest to konieczne, zwiœszcza jeœli preparaty z prób były przygotowywane przy zastosowaniu opalania (patrz: 2.2).

Przygotować oddzielne szkiełka kontroli pozytywnej szczepu homologicznego lub innego szczepu odniesienia *C. m. subsp. sepedonicus*, zawieszonego w ekstrakcie z ziemniaka, jak szczególowo opisano w dodatku 2, oraz ewentualnie w buforze.

W miarę moŹliwoœci na to samo szkiełko naleŹy nanieœć jako podobnĂ kontrolę naturalnie zainfekowane tkanki (zachowane w formie liofilizowanej lub zamroŹone w temperaturze od – 16 do – 24 °C).

Jako kontrolę negatywną stosować ekstrakty prób, które wcześniej dały w teście wynik ujemny.

Używać wielopunktowych szkiełek mikroskopowych, najlepiej z 10 okienkami, o średnicy co najmniej 6 mm.

Badać materiał kontrolny w identyczny sposób jak próbę(-y).

4.1. Przygotować szkiełka testowe według jednej z następujących procedur:

i) W przypadku osadu zawierającego stosunkowo niewielkie ilości skrobi:

Za pomocą pipety nanieść na pierwsze okienko odmierzoną standardową objętość (15 µl jest odpowiednią objętością dla okienek o średnicy 6 mm — zwiększyć objętość w przypadku okienek o większej średnicy) rozcieńczenia 1/100 zawieszono osadu ziemniaka. Kolejno nanosić podobną objętość nierozcieńzonego osadu (1/1) na pozostałe okienka w rzędzie. Drugi rząd może być użyty jako powtórzenie lub do drugiej próby, zgodnie ze schematem na rysunku 1.

ii) Dla innych osadów:

Przygotować dziesięciokrotne rozcieńczenia (1/10 i 1/100) zawiesiny w buforze do zawieszania osadu. Nanieść standardową objętość (15 µl odpowiada 6 mm średnicy okienka — dla większych okienek odmierzyć proporcjonalnie większą objętość) zawiesiny na szereg okienek za pomocą pipety. Drugi rząd może być użyty jako powtórzenie lub do drugiej próby, zgodnie ze schematem na rysunku 2.

4.2. Krople suszyć w temperaturze pokojowej lub przez podgrzewanie w temperaturze od 40 do 45 °C. Komórki bakteryjne utrwalać na szkiełku albo przez podgrzewanie (15 minut przy 60 °C), opalanie, 95-procentowym etanolem lub według szczegółowych instrukcji dostawcy przeciwciał.

Jeśli trzeba, przed dalszym testowaniem, utrwalone szkiełka mogą być przechowywane w stanie zamrożonym w suchym pojemniku tak krótko jak to możliwe (do trzech miesięcy).

4.3. Metoda IF:

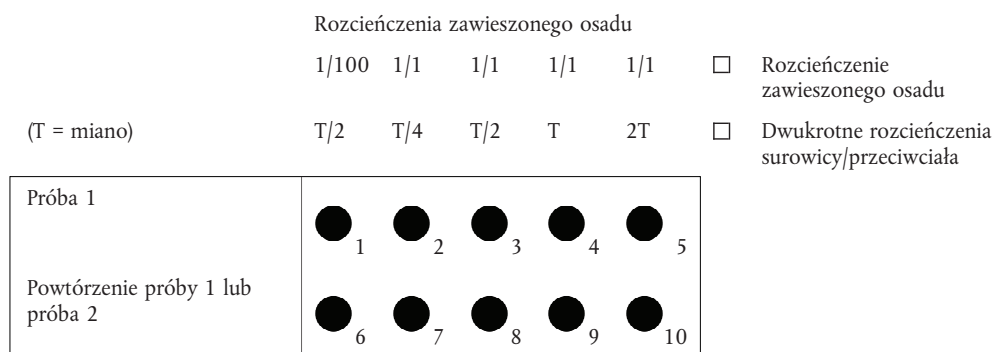
i) Przygotować szkiełka tak jak opisano w części 4.1 ppkt i):

Przygotować zestaw dwukrotnych rozcieńczeń surowicy w buforze IF. Pierwsza studzienka powinna zawierać roztwór o mianie 1/2 (T/2), inne o mianie 1/4 (T/4), mianie 1/2 (T/2), mianie (T) i mianie 2 (2T).

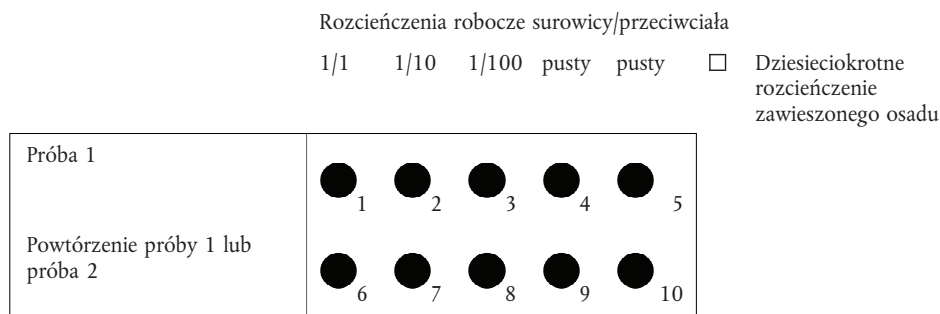
ii) Przygotować szkiełka tak jak opisano w części 4.1 ppkt ii):

Przygotować rozcieńczenie robocze (RR) surowicy w buforze IF. Rozcieńczenie robocze ma wpływ na specyficzność.

Rysunek 1. Przygotowanie szkiełka testowego zgodnie z częścią 4.1 ppkt i) i częścią 4.3 ppkt i)



Rysunek 2. Przygotowanie szkiełka testowego zgodnie z częścią 4.1 ppkt ii) i częścią 4.3 ppkt ii)



- 4.3.1. Ułożyć szkiełka na wilgotnym papierze. Całkowicie pokryć każde okienko roztworem(-ami) przeciwciał. Objętość przeciwciał nakładanych na każde okienko musi co najmniej odpowiadać objętości nakładanego ekstraktu.

W przypadku braku szczegółowych instrukcji od dostawcy przeciwciał należy postępować według następującej procedury:

- 4.3.2. Inkubować preparaty na wilgotnym papierze pod przykryciem przez 30 minut w temperaturze otoczenia (18–25 °C).
- 4.3.3. Strząsnąć kropelki z każdego szkiełka i delikatnie przepłukać buforem IF. Umyć przez zanurzenie na 5 minut w buforze IF Tween (dodatek 3), a następnie przez 5 minut w buforze IF. Unikać powstawania aerozoli i przeniesienia kropelek, co mogłoby doprowadzić do kontaminacji między próbami. Ostrożnie usunąć nadmiar wilgoci przez delikatne osuszanie bibułą.
- 4.3.4. Ułożyć szkiełka na wilgotnym papierze. Pokryć okienka testowe roztworem koniugatu FITC używanym do określenia miana. Objętość koniugatu nakładanego na okienka musi być identyczna z objętością nakładanych przeciwciał.
- 4.3.5. Inkubować preparaty na wilgotnym papierze pod przykryciem przez 30 minut w temperaturze otoczenia (18–25 °C).
- 4.3.6. Strząsnąć krople koniugatu ze szkiełka. Wypłukać i umyć jak poprzednio (4.3.3).

Delikatnie usunąć nadmiar wilgoci.

- 4.3.7. Na każde okienko nanieść pipetą 5–10 µl 0,1M buforu fosforanowo-glicerynowego (dodatek 3) lub komercyjnego utrwalacza zapobiegającego odbarwianiu i nakryć szkiełkiem nakrywkowym.

#### 4.4. Odczytywanie testu IF:

- 4.4.1. Pod mikroskopem epifluorescencyjnym z filtrami odpowiednimi do wzbudzenia FITC, przy powiększeniu 500–1 000, z użyciem imersji olejowej lub wodnej obejrzyć szkiełka testowe. Okienka przeglądać w poprzek dwóch średnic przeciętych pod kątem prostym oraz wokół obwodu okienka. W przypadku prób niezawierających komórek lub zawierających ich niewiele obserwować co najmniej 40 pól.

Sprawdzić najpierw szkiełko z kontrolą pozytywną. Komórki muszą być wyraźnie zabarwione i wykazywać jaskrawą fluorescencję przy ustalonym mianie lub rozcieńczeniu roboczym. W przypadku niewłaściwego zabarwienia test IF musi zostać powtórzony (część 4).

- 4.4.2. Poszukiwać w okienkach szkiełek testowych jaskrawo fluoryzujących komórek, o charakterystycznej morfologii *C. m. subsp. sepedonicus* (patrz: strona internetowa <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Intensywność fluorescencji musi być taka sama jak lub większa niż szczepu użytego jako kontrola pozytywna przy tym samym rozcieńczeniu przeciwciał. Komórki niecałkowicie zabarwione lub słabo fluoryzujące należy pominąć.

Jeśli zachodzi jakiegokolwiek podejrzenie kontaminacji, test należy powtórzyć. Może tak być, jeśli wszystkie płytki w danej partii zawierają dodatnie komórki z powodu kontaminacji buforu lub jeśli na powierzchni szkiełka występują komórki dodatnie (poza okienkiem szkiełka).

- 4.4.3. Ze specyficznością testu immunofluorescencyjnego wiąże się nieodłącznie kilka problemów. W osadzie z części przystolonowych bulw ziemniaka i odcinka łodygi prawdopodobne jest występowanie w tle populacji fluoryzujących komórek o nietypowej morfologii oraz bakterii saprofitycznych o wielkości i morfologii podobnej do *C. m. sepedonicus* i dających reakcje krzyżowe.

4.4.4. Uwzględnić wyłącznie fluoryzujące komórki o typowych wymiarach i morfologii przy mianie lub rozcieńczeniu roboczym, takim jak w części 4.3.

4.4.5. Interpretacja odczytów IF:

- i) Jeśli zostanie stwierdzona obecność jaskrawo fluoryzujących komórek o charakterystycznej morfologii, należy oszacować przeciętną liczbę typowych komórek w polu widzenia i obliczyć liczbę typowych komórek na ml zawieszonego osadu (dodatek 4).

Wynik IF jest dodatni dla prób z przynajmniej  $5 \times 10^3$  typowych komórek na ml zawieszonego osadu. Próba uznawana jest za potencjalnie porażoną i wymagane są dalsze testy.

- ii) Odczyt IF jest ujemny w przypadku prób o liczbie komórek mniejszej niż  $5 \times 10^3$  na ml zawieszonego osadu i próba jest uznawana za ujemną. Kolejne testy nie są wymagane.

5. TEST FISH

#### Zasada

W przypadku gdy test FISH jest stosowany jako pierwszy test przesiewowy i stwierdza się w nim wynik dodatni, należy przeprowadzić test IF jako drugi, obowiązkowy test przesiewowy. Kiedy test FISH jest stosowany jako drugi test przesiewowy i daje wynik dodatni, do ukończenia diagnozowania konieczne jest przeprowadzenie dalszych testów, zgodnie ze schematem blokowym.

#### Uwaga:

Stosować zatwierdzone sondy oligonukleotydowe specyficzne dla *C. m. subsp. sepedonicus* (dodatek 7). Wstępne testy z użyciem tej metody powinny pozwolić na powtarzalne wykrywanie przynajmniej  $10^3$ – $10^4$  komórek *C. m. subsp. sepedonicus* na ml dodanych do ekstraktów prób, które wcześniej dały w testach wynik ujemny.

Następującą procedurę najlepiej jest stosować na świeżo przygotowanym ekstrakcie próby, ale może ona być także z powodzeniem stosowana na ekstrakcie próby, przechowywanym pod gliceryną w temperaturze od  $-16$  do  $-24$  °C lub od  $-68$  do  $-86$  °C.

Jako kontroli negatywnych używać ekstraktu prób, które wcześniej dały wynik ujemny w testach na *C. m. subsp. sepedonicus*.

Jako kontrole pozytywne stosować zawiesiny zawierające od  $10^5$  do  $10^6$  komórek *C. m. subsp. sepedonicus* na ml (np. NCPPB 4053 lub PD 406) w 0,01M buforze fosforanowym, przygotowane z 3–5 dniowej kultury (sposób przygotowania opisano w dodatku 2). Przygotować oddzielne szkiełka kontroli pozytywnej z homologicznego szczepu lub dowolnego innego szczepu odniesienia *C. m. subsp. sepedonicus*, zawieszonego w ekstrakcie z ziemniaków, jak opisano w dodatku 2.

Stosowanie znakowanej FITC eubakteryjnej sondy oligonukleotydowej daje możliwość kontrolowania procesu hybrydyzacji, ponieważ barwione będą wszystkie eubakterie obecne w próbce.

Badać materiał kontrolny w identyczny sposób jak próbę(-y).

#### 5.1. Utrwalanie ekstraktu z ziemniaków

Poniższa procedura oparta jest na pracy Wullings *et al.*, (1998):

5.1.1. Przygotować roztwór utrwalający (patrz dodatek 7).

5.1.2. Za pomocą pipety przenieść 100 µl ekstraktu każdej próby do probówki Eppendorfa i wirować przez 8 min przy 7 000 g.

5.1.3. Usunąć supernatant i rozpuścić osad w 500 µl utrwalacza przygotowanego < 24 godziny wcześniej. Zamieszać i inkubować do następnego dnia przy 4 °C.

Alternatywnym utrwalaczem jest 96-procentowy etanol. W tym przypadku rozpuścić osad z etapu 5.1.2 w 50 µl 0,01M PB i 50 µl 96 % etanolu. Zworteksować mieszaninę i inkubować przez 30–60 minut w 4 °C.







5.2.10. Przenieść statyw do szkiełek do 1/2 roztworu do płukania hybmix i poddawać inkubacji przez następnych 15 minut.

5.2.11. Zanurzyć na krótko szkiełka w ultraczystej wodzie, a następnie położyć je na bibule filtracyjnej. Usunąć nadmiar wilgoci przez delikatne przykrycie powierzchni bibułą filtracyjną. Nanieść pipetą 5–10 µl roztworu utrwalającego, zapobiegającego odbarwieniu (np. Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA lub równoważny) na każde okienko i nałożyć duże (24 × 60 mm) szkiełko nakrywkowe na całe szkiełko podstawowe.

### 5.3. Odczytywanie testu FISH

5.3.1. Oglądać szkiełka natychmiast, używając mikroskopu dostosowanego do mikroskopii epifluorescencyjnej pod powiększeniem 630 lub 1000x, pod olejkiem imersyjnym. Przy filtrze odpowiednim do izotiocyjanianu fluoresceiny (FITC), komórki eubakteryjne (w tym większość komórek Gram ujemnych) są zabarwione na kolor fluorescencyjnie zielony. Przy stosowaniu filtra do 5-izotiocyjanianu tetrametylorodaminy barwione komórki *Cy3 C. m. subsp. sepedonicus* są fluoryzujące czerwone. Morfologię komórek porównać z tą w kontroli pozytywnej. W przypadku niewłaściwego zabarwienia test FISH (część 9.4) należy powtórzyć. Okienka przeglądać w poprzek dwóch średnic przeciętych pod kątem prostym oraz wokół obwodu okienka. W przypadku prób niezawierających komórek lub zawierających ich niewiele obserwować co najmniej 40 pól.

5.3.2. Poszukiwać w okienkach szkiełek testowych jaskrawo fluoryzujących komórek, o charakterystycznej morfologii *C. m. subsp. sepedonicus* (patrz: strona internetowa <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Intensywność fluorescencji musi być taka sama jak lub większa niż szczepu użytego jako kontrola pozytywna. Komórki niecałkowicie zabarwione lub słabo fluoryzujące należy pominąć.

5.3.3. Jeśli zachodzi jakiegokolwiek podejrzenie kontaminacji, test należy powtórzyć. Może tak być, jeśli wszystkie płytki w danej partii zawierają dodatnie komórki z powodu kontaminacji buforu lub jeśli na powierzchni szkiełka występują komórki dodatnie (poza okienkiem szkiełka).

5.3.4. Ze specyficznością testu FISH wiąże się nieodłącznie kilka problemów. W osadzie z części przystolonowej bulw ziemniaka i fragmentów łądzy prawdopodobne jest występowanie w tle populacji fluoryzujących komórek o nietypowej morfologii oraz dających reakcje krzyżowe bakterii saprofitycznych o wielkości i budowie podobnej do *C. m. subsp. sepedonicus* choć znacznie rzadziej niż w przypadku testu IF.

5.3.5. Uwzględnić wyłącznie fluoryzujące komórki o typowych wymiarach i morfologii, patrz: część 5.3.2.

5.3.6. Interpretacja wyniku testu FISH:

- i) Prawidłowe wyniki testu FISH są otrzymywane wtedy, gdy przy użyciu filtra FITC obserwuje się jaskrawozielone, fluoryzujące komórki o wielkości i morfologii typowej dla *C. m. subsp. sepedonicus* i jeśli we wszystkich kontrolach pozytywnych, a w żadnej kontroli negatywnej, są obserwowane przy użyciu filtra rodaminowego jaskrawoczerwone fluoryzujące komórki. Jeśli zostanie stwierdzona obecność jaskrawo fluoryzujących komórek o charakterystycznej morfologii, należy oszacować przeciętną liczbę typowych komórek w polu widzenia i obliczyć liczbę typowych komórek na ml zawieszonego osadu (dodatek 4). Próby z przynajmniej  $5 \times 10^3$  typowych komórek na ml zawieszonego osadu są uznawane za potencjalnie porażone. Potrzebne są dalsze testy. Próby, w których występuje mniej niż  $5 \times 10^3$  typowych komórek na ml zawieszonego osadu, są uważane za ujemne.
- ii) Test FISH jest ujemny, jeśli przy użyciu filtra rodaminowego nie są obserwowane jaskrawo fluoryzujące komórki o wielkości i morfologii typowej dla *C. m. subsp. sepedonicus*, pod warunkiem że w preparatach kontroli pozytywnej przy użyciu filtra rodaminowego obserwowane są jaskrawoczerwone fluoryzujące komórki.

## 6. TEST PCR

### Zasady

Kiedy test PCR jest stosowany jako główny test przesiewowy i daje wynik dodatni, należy przeprowadzić test IF jako drugi, obowiązkowy test przesiewowy. Kiedy test PCR jest stosowany jako drugi test przesiewowy i daje wynik dodatni, do ukończenia diagnozowania konieczne jest przeprowadzenie dalszych testów, zgodnie ze schematem blokowym.

Pełne wykorzystanie tej metody jako głównego testu przesiewowego jest zalecane, tylko w przypadku, gdy uzyskano ekspertyzę specjalistyczną.

**Uwaga:**

Wstępne testy przy zastosowaniu tej metody powinny pozwolić na powtarzalne wykrywanie od  $10^3$  do  $10^4$  komórek *C. m. subsp. sepedonicus* na ml dodanych do ekstraktów prób, które we wcześniejszych testach okazały się ujemne. Mogą być wymagane eksperymenty optymalizacyjne, aby we wszystkich laboratoriach osiągnąć maksymalny poziom czułości i specyficzności.

Stosować zatwierdzone odczynniki do procedury PCR. Najlepiej wybrać metodę z kontrolą wewnętrzną.

Stosować właściwe środki ostrożności, aby uniknąć kontaminacji próby docelowym DNA. Test PCR powinien być przeprowadzony przez doświadczonych techników, w przeznaczonych do tego laboratoriach biologii molekularnej, aby możliwość kontaminacji docelowym DNA była jak najmniejsza.

Kontrole negatywne (ekstrakcja DNA i metoda PCR) należy zawsze przeprowadzać jako ostatnie próby w procedurze, aby upewnić się, czy nie nastąpiło jakiegokolwiek przeniesienie DNA.

W teście PCR powinny się znaleźć następujące kontrole negatywne:

- Ekstrakt próby, która wcześniej okazała się w testach ujemna pod względem *C. m. subsp. sepedonicus*.
- Bufory kontrolne stosowane do ekstrakcji bakterii i DNA z próby.
- Mieszanina do reakcji PCR.

Należy uwzględnić następujące kontrole pozytywne:

- Zawiesiny osadów, do których dodano *C. m. subsp. sepedonicus* (przygotowanie, patrz: dodatek 2).
- Zawiesina  $10^6$  komórek na ml *C. m. subsp. sepedonicus* w wodzie z wirulentnym izolatem (np. NCPPB 2140 lub NCPPB 4053).
- Jeśli to możliwe, przeprowadzając test PCR korzystać także z ekstraktu DNA z kontroli pozytywnych.

*Aby uniknąć potencjalnej kontaminacji, przygotowywać kontrole dodatnie w miejscu odizolowanym od prób, które mają zostać poddane testom.*

Ekstrakty stanowiące próby powinny być jak najdokładniej oczyszczone z ziemi. Być może w niektórych przypadkach godne polecenia byłoby przygotowanie ekstraktów z umytych ziemniaków, jeśli mają zostać zastosowane procedury PCR.

### 6.1. Metody oczyszczania DNA

Stosować kontrolę pozytywną i negatywną, jak opisano powyżej.

Przygotować materiał kontrolny w sposób identyczny jak próbę(-y).

Istnieje wiele metod oczyszczania docelowego DNA ze złożonych substratów próby, a zarazem usuwania inhibitorów PCR i innych reakcji enzymatycznych oraz koncentracji docelowego DNA w ekstrakcie z próby.

Metoda przedstawiona poniżej została zoptymalizowana do użytku z zatwierdzoną metodą PCR przedstawioną w dodatku 6.

#### 6.1.a) Metoda według Pastrika (2000)

1. Wkroplic 220  $\mu$ l roztworu buforowego do lizy (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) do 1,5 ml próbówki Eppendorfa.
2. Dodać 100  $\mu$ l ekstraktu próby i umieścić na 10 minut w bloku grzejmym lub w łaźni wodnej w 95 °C.
3. Umieścić próbówkę na lodzie na 5 minut.
4. Dodać 80  $\mu$ l roztworu lizozymu (50 mg lizozymu na ml w 10 mM Tris HCl, pH 8,0) i inkubować przez 30 minut w 37 °C.
5. Dodać 220  $\mu$ l roztworu Easy DNA<sup>®</sup> solution A (Invitrogen), wymieszać dobrze za pomocą worteksu i przez 30 minut inkubować w 65 °C.

6. Dodać 100 µl roztworu Easy DNA<sup>®</sup> solution B (Invitrogen), energicznie mieszać, dopóki osad nie zacznie swobodnie przemieszczać się w probówce, a próba stanie się jednolicie kleista.
7. Dodać 500 µl chloroformu i mieszać, dopóki lepkość nie zmniejszy się, a mieszanina nie stanie się homogeniczna.
8. Wirować przez 20 minut przy 15 000 g w temperaturze 4 °C, aby rozdzielić fazy i utworzyć interfazę.
9. Przenieść górną fazę do nowej próbówki Eppendorfa.
10. Dodać 1 ml 100 % etanolu (– 20 °C), przez krótką chwilę mieszać i inkubować na lodzie przez 10 minut.
11. Wirować przez 20 minut przy 15 000 g w temp. 4 °C i usunąć etanol z osadu.
12. Dodać 500 µl 80 % etanolu (– 20 °C) i zamieszać przez odwrócenie próbówki.
13. Wirować przez 10 minut przy 15 000 g w temp. 4 °C, zachować osad i usunąć etanol.
14. Pozwolić, aby osad wysechł na powietrzu lub w wirówce próżniowej DNA.
15. Zawiesić osad w 100 µl sterylnej UPW i pozostawić w temperaturze pokojowej co najmniej na 20 minut.
16. Przechowywać w temp. – 20 °C do momentu, kiedy będzie potrzebny do PCR.
17. Oddzielić cały biały precipitat przez wirowanie i użyć do PCR 5 µl supernatantu zawierającego DNA.

#### 6.1.b) Inne metody

Można zastosować inne metody ekstrakcji DNA (np. Qiagen DNeasy Plant Kit), pod warunkiem że wykazano, iż są one równie skuteczne w oczyszczaniu DNA pochodzącego z prób kontrolnych zawierających od 10<sup>3</sup> do 10<sup>4</sup> komórek patogenu na ml.

#### 6.2. PCR

- 6.2.1. Przygotować matryce testowe i kontrolne do PCR zgodnie z zatwierdzoną procedurą (dodatek 6). Przygotować jedno dziesięciokrotne rozcieńczenie ekstraktu próby DNA (1:10 w UPW).
- 6.2.2. Przygotować odpowiednią mieszaninę reakcyjną PCR w nieskażonym środowisku, zgodnie z ustaloną procedurą (dodatek 6). Zatwierdzona procedura PCR jest złożoną reakcją, która obejmuje także wewnętrzną kontrolę PCR.
- 6.2.3. Dodać 5 µl ekstraktu DNA na 25 µl mieszaniny reakcyjnej PCR w sterylnych probówkach PCR.
- 6.2.4. Dołączyć kontrolę negatywną zawierającą tylko mieszaninę reakcyjną PCR i dodać tę samą UPW, która była używana w mieszaninie PCR zamiast próby.
- 6.2.5. Umieścić próbówki w tym samym termocyklerze, który był używany w badaniu wstępnym, i uruchomić odpowiednio skonfigurowany program PCR (dodatek 6).

#### 6.3. Analiza produktu PCR

- 6.3.1. Rozdzielić amplikony PCR metodą elektroforezy na żelu agarozowym. Użyć co najmniej 12 µl mieszaniny reakcyjnej amplifikowanego DNA z każdej próby, zmieszanego z 3 µl buforu obciążającego (dodatek 6) w 2,0 % (masa/obj.) żelu agarozowym w buforze tris-acetate-EDTA (TAE) (dodatek 6) przy 5–8 V na cm. Stosować odpowiedni marker DNA, np. 100 bp ladder.
- 6.3.2. Uwidocznić prążki DNA przez barwienie w bromku etydyny (0,5 mg na L) przez 30–45 min, stosując *odpowiednie środki ostrożności przy obchodzeniu się z tym mutagenem*.
- 6.3.3. Oglądać zabarwiony żel w transiluminatorze UV przy małej długości fal (np. λ = 302 nm), szukając zamplifikowanych produktów PCR o oczekiwanej wielkości (dodatek 6), i udokumentować wyniki.

- 6.3.4. Dla wszystkich nowych wyników/przypadków weryfikować autentyczność amplikonu PCR, przeprowadzając analizę z użyciem enzymów restrykcyjnych na próbce pozostałego zamplifikowanego DNA przez inkubację w optymalnej temperaturze i przez odpowiedni czas z właściwym enzymem i buforem (patrz dodatek 6). Rozdzielić strawione fragmenty za pomocą elektroforezy na żelu agarozowym jak wcześniej i oglądać charakterystyczny układ fragmentów strawionych przez enzymy restrykcyjne w transiluminatorze UV po uprzednim barwieniu bromkiem etydyny. Porównać z niestrawioną i strawioną kontrolą pozytywną.

Interpretacja wyniku testu PCR:

Test PCR daje wynik ujemny, jeśli specyficzny dla *C. m. subsp. sepedonicus* amplikon PCR o oczekiwanej wielkości nie zostanie wykryty w badanej próbce, ale jest wykrywany we wszystkich kontrolach pozytywnych (w przypadku wielokrotnego PCR ze specyficznymi roślinnymi starterami kontroli wewnętrznej; drugi produkt PCR o oczekiwanej wielkości musi być zamplifikowany z badaną próbą).

Test PCR daje wynik dodatni, jeśli stwierdzi się obecność specyficznego dla *C. m. subsp. sepedonicus* o oczekiwanej wielkości i o oczekiwanej wzorze restrykcji (jeśli to wymagane) amplikonu PCR, pod warunkiem że nie jest on amplifikowany z którejkolwiek kontroli negatywnej. Wiarygodne potwierdzenie wyniku dodatniego można także uzyskać, powtarzając test z drugim zestawem starterów PCR (część 9.3).

Uwaga:

Można podejrzewać inhibicję PCR, jeśli oczekiwany amplikon został uzyskany z kontroli pozytywnej, zawierającej amplikon *C. m. subsp. sepedonicus* w wodzie, ale przy badaniu kontroli pozytywnej z *C. m. subsp. sepedonicus* w ekstrakcie ziemniaczanym zostały uzyskane wyniki ujemne. W procedurach wielokrotnego PCR na inhibicję reakcji wskazuje sytuacja, w której nie jest otrzymany żaden z dwóch amplikonów.

Kontaminacji można się spodziewać, jeśli oczekiwany amplikon otrzymywany jest w jednej lub więcej kontrolach negatywnych.

## 7. TEST BIOLOGICZNY

Uwaga:

Wstępne testy przy użyciu tej metody powinny pozwolić na powtarzalne wykrywanie od  $10^3$  do  $10^4$  jednostek tworzących kolonie *C. m. subsp. sepedonicus* na ml dodanych do ekstraktów prób, które we wcześniejszych testach dały wyniki ujemne (sposób przygotowania opisano w dodatku 2).

Najwyższej czułości wykrywania można oczekiwać, kiedy stosuje się świeżo przygotowane ekstrakty i zapewnia się optymalne warunki wzrostu. Metodę tę można jednak z powodzeniem stosować do ekstraktów, które były przechowywane pod glicerolem w temp. od  $-68$  do  $-86$  °C.

Niektóre odmiany oberżyny stanowią znakomite selektywne wzbogacone podłoże do wzrostu *C. m. subsp. sepedonicus* nawet przy braku objawów i stanowią także świetny test potwierdzający obecność bakterii w organizmie żywiciela.

Należy zapewnić optymalne warunki wzrostu, aby zredukować niebezpieczeństwo otrzymania fałszywie ujemnych wyników testu.

Szczegóły hodowli zamieszczono w dodatku 8.

- 7.1. Rozdzielić między rośliny oberżyny całą pozostałą zawieszinę testową osadu według opisu w częściach 3.1.6 lub 3.2.5, stosując jedną z metod opisanych poniżej (7.3 lub 7.4). Używać wyłącznie roślin w stadium liści 2–3, do pełnego rozwoju trzeciego liścia właściwego. Aby zapewnić całkowite wykorzystanie zawieszonego osadu, jak również skuteczną inokulację, w procedurach przedstawionych poniżej należy zastosować 15–25 roślin oberżyny na jedną próbę.
- 7.2. Nie podlewać roślin oberżyny przez 1–2 dni przed inokulacją, aby zmniejszyć turgor.
- 7.3. Inokulacja przez nacięcie
- 7.3.1. Trzymając roślinę między dwoma palcami, nanieść na łodygę kroplę (średnio 5–10  $\mu$ l) zawieszonego osadu w miejscu między liścieniami i pierwszym liściem.
- 7.3.2. Za pomocą sterylnego skalpela wykonać ukośne nacięcie, o długości 1,0 cm i na głębokość średnio 2/3 grubości łodygi, rozpoczynając od miejsca naniesienia kropli osadu.
- 7.3.3. Ranę zamknąć sterylną wazeliną ze strzykawki.

- 7.4. Inokulacja za pomocą strzykawki
- Inokulować łodygi oberżyny powyżej liścieni za pomocą strzykawki z igłą do iniekcji podskórnej (nie mniejszej niż 23 G). Próbkę rozdzielić między rośliny oberżyny.
- 7.5. W celu otrzymania kontroli pozytywnej inokulować 5 roślin wodną zawiesiną od  $10^5$  do  $10^6$  komórek na ml znanej hodowli *C. m. subsp. sepedonicus* i, jeśli to możliwe, naturalnie porażoną tkanką bulwy (patrz: część 4), stosując tę samą metodę inokulacji (7.3 lub 7.4).
- 7.6. W celu otrzymania kontroli negatywnej inokulować pięć roślin sterylnym buforem do zawieszania osadu, stosując tę samą metodę inokulacji (7.3 lub 7.4).
- 7.7. Rośliny inkubować w pomieszczeniach do kwarantanny w temperaturze 18–24 °C do 4 tygodni, przy dostatecznym oświetleniu i wysokiej wilgotności (70–80 %) i podlewać je tak, aby nie dopuścić do gromadzenia się wody lub wędnięcia z powodu niedoboru wody. Komórki *C. m. subsp. sepedonicus* giną w temperaturze powyżej 30 °C, zaś temperatura dla nich optymalna wynosi 21 °C. Aby uniknąć kontaminacji, należy inkubować rośliny stanowiące kontrolę pozytywną i negatywną w wyraźnie odizolowanych od siebie miejscach w szklarni lub w komorze wzrostowej lub, jeśli brak dostatecznie dużych powierzchni, zapewnić ścisłą izolację poszczególnych zabiegów. Jeśli rośliny należące do różnych prób muszą być blisko siebie, odizolować je za pomocą ekranów. Przy nawożeniu, podlewaniu, sprawdzaniu lub innych manipulacjach zachować wielką ostrożność, aby uniknąć kontaminacji. Jest kwestią zasadniczej wagi, aby w komorze wzrostowej nie było żadnych owadów szkodników, ponieważ mogą one przenosić bakterie z jednej próby na drugą.
- 7.8. Po tygodniu należy zacząć regularnie sprawdzać, czy nie występują objawy. Policzyć rośliny wykazujące objawy. *C. m. subsp. sepedonicus* powoduje wędnięcie liści oberżyny, które może rozpoczynać się od brzegów lub przetrzeni międzynervowej. Zwiędnięte tkanki mogą być początkowo ciemnozielone lub plamiste, lecz zanim ulegną nekrozie, stają się jaśniejsze. Wędnące tkanki między nerwami wyglądają często na „tłuste”, nasączone wodą. Tkanki nekrotyczne mają często jasnożółty brzeg. Rośliny nie zawsze zamierają; im dłuższy okres poprzedzający wystąpienie objawów, tym większa szansa na przeżycie. Rośliny mogą pokonać infekcję. Młode rośliny oberżyny są znacznie bardziej podatne na *C. m. subsp. sepedonicus* o niskiej liczebności populacji niż rośliny starsze, stąd konieczność stosowania roślin w stadium trzech liści lub nieco młodszych.
- Wędnięcia mogą być również spowodowane przez populacje innych bakterii lub grzybów zasiedlających tkanki bulwy. Do nich należą *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* i *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *Erwinia chrysanthemi*, *Phoma exigua* var. *foveata*, jak również duże populacje bakterii saprofitycznych. W szczególności *Erwinia chrysanthemi* może powodować na liściach objawy oraz wędnięcie bardzo podobne do objawów *C. m. subsp. sepedonicus*. Jedyną różnicą jest czernienie łodyg w przypadku zakażenia *Erwinia chrysanthemi*. Wędnięcie spowodowane przez *C. m. subsp. sepedonicus* od innych wędnięć można wtedy odróżnić, gdy gwałtownie wędną całe liście lub rośliny. Można również przygotować barwienie metodą Grama: test ten pozwoli na odróżnienie *C. m. subsp. sepedonicus* od *Erwinia* spp.
- 7.9. Niezwłocznie po stwierdzeniu objawów w roślinach oberżyny należy przeprowadzić procedurę reizolacji, stosując fragmenty zwiędniętej tkanki liściowej lub tkanki łodygi (macerację tkanki opisano w 3.1.3). Liście i łodygi oberżyny zdezynfekować powierzchniowo poprzez przetarcie 70 % alkoholem etylowym. Przeprowadzić test IF lub PCR na soku oberżyny i izolować na właściwe (selektywne) podłoża (patrz: część 8). Można także przygotować barwienie metodą Grama (dodatek 9). Zidentyfikować oczyszczone hodowle podejrzewane o obecność *C. m. subsp. sepedonicus* i potwierdzić patogeniczność (patrz: części 9 i 10).
- 7.10. W niektórych okolicznościach, w szczególności gdy warunki uprawy nie są optymalne, istnieje możliwość występowania *C. m. subsp. sepedonicus* w formie infekcji utajonej w oberżynie, nawet po czterotygodniowej inkubacji. Jeśli po czterech tygodniach nie są obserwowane żadne objawy, przeprowadzić test IF/PCR na próbie składającej się z jednocentymetrowych odcinków łodyg każdej rośliny testowej, pobranych powyżej miejsca inokulacji. Jeśli test daje wynik dodatni, należy przeprowadzić reizolację na właściwej (selektywnej) pożywce po przeprowadzeniu procedury opisanej w części 8. Zidentyfikować oczyszczone hodowle podejrzewane o obecność *C. m. subsp. sepedonicus* i potwierdzić patogeniczność (część 9 i 10).

Interpretacja wyniku testu biologicznego.

Prawidłowe wyniki testu biologicznego są uzyskiwane, kiedy rośliny stanowiące kontrolę pozytywną wykazują typowe objawy, bakterie z tych roślin mogą być reizolowane, a na roślinach będących kontrolą negatywną nie występują objawy.

Test biologiczny jest ujemny, jeśli rośliny testowe nie są porażone *C. m. subsp. sepedonicus*, a *C. m. subsp. sepedonicus* jest wykrywany w roślinach będących kontrolą pozytywną.

Test biologiczny jest dodatni, jeśli rośliny testowe są porażone *C. m. subsp. sepedonicus*.

## 8. IZOLACJA *C. M. SUBSP. SEPEDONICUS*

### Uwaga:

Diagnoza jest kompletna tylko wówczas, jeżeli *C. m. subsp. sepedonicus* zostanie wyizolowany, następnie zidentyfikowany (patrz: część 9) i potwierdzony za pomocą testu patogeniczności (część 10). Choć *C. m. subsp. sepedonicus* jest organizmem wymagającym, może być wyizolowany z tkanki, na której występują objawy.

Jednakże może on być zagłuszany przez szybko rosnące bakterie saprofityczne i dlatego bezpośrednia izolacja z osadu uzyskanego z tkanek bulwy lub łodygi ziemniaka (część 3.1.6 lub 3.2.5) jest trudna. Bezpośrednia izolacja *C. m. subsp. sepedonicus* jest możliwa przy zastosowaniu selektywnej pożywki i właściwego rozcieńczenia osadu z części przystolonowych bulw lub łodyg ziemniaka.

Izolacji należy dokonać ze wszystkich wykazujących objawy bulw i łodyg ziemniaka oraz roślin oberżyny, na których nie obserwowano objawów, ale wynik testu IF/PCR próby był dodatni (patrz: część 7.10). Macerację łodyg oberżyny, o ile jest to konieczne, należy wykonać, jak podano w części 3.1.3.

Aby przygotować kontrole pozytywne, należy sporządzić dziesięciokrotne rozcieńczenia z zawiesiny  $10^6$  cfu (jednostek tworzących kolonie) na ml *C. m. subsp. sepedonicus* (np. NCPPB 4053 lub PD 406). Aby uniknąć jakiegokolwiek możliwości kontaminacji, przygotować kontrole pozytywne w całkowitej izolacji od prób, które mają być poddane testowi.

Dla każdej świeżo przygotowanej partii pożywki selektywnej przed użyciem do testowania rutynowych prób należy sprawdzić jej przydatność do hodowli czynnika chorobotwórczego.

Badać materiał kontrolny w identyczny sposób jak próbę(-y).

## 8.1. Posiew na podłoża selektywne

8.1.1. Ze 100 µl zawiesiny osadu ziemniaka lub soku oberżyny przyrządzić dziesięciokrotne rozcieńczenia w buforze do zawieszania osadu (dodatek 3).

8.1.2. Izolacja z nierozcieńzonego osadu ziemniaków zwykle się nie udaje z powodu wysokich wymagań *Cms* i konkurencji saprofitów. Ponieważ bakteria jest zwykle obecna w porażonej tkance w dużych ilościach, możliwe jest wyeliminowanie saprofitów przez kolejne rozcieńczenia. Zaleca się wobec tego nanieść 100 µl z każdej próby, w rozcieńczeniu 1/100 do 1/10 000, na podłoża MTNA lub NCP-88 (dodatek 5) (jeśli używane są szalki Petriego o średnicy 90 mm, dostosować objętość do innych wymiarów szalki), stosując głaszczki i technikę rozsmarowywania.

### Uwaga:

Alternatywnym sposobem postępowania jest nałożenie początkowych 100 µl zawiesiny osadu ziemniaka na pierwszą płytkę agarową za pomocą głaszczki, a następnie przeniesienie na drugą płytkę, wreszcie powtórzenie tego z trzecią płytką, w ten sposób osiągając efekt nakładania rozcieńczeń poprzez głaszczkę.

8.1.3. Inkubować szalki w ciemności, w temp. 21–23 °C.

8.1.4. Przeglądanie szalek polegające na porównaniu z szalkami kontrolnymi, zliczaniu wszelkich kolonii przypominających *C. m. subsp. sepedonicus* należy przeprowadzać po trzech dniach, z kolejnymi zliczeniami po 5, 7 i 10 dniach.

## 8.2. Oczyszczanie podejrzanych kolonii

### Uwaga:

Oczyszczanie kolonii przypominających *C. m. subsp. sepedonicus* przez pasażowanie powinno być prowadzone na pożywce YGM w celu inokulacji roślin oberżyny i/lub późniejszej identyfikacji; należy to zrobić zanim nie nastąpi nadmierny wzrost bakterii na płytkach, tj. najlepiej po 3–5 dniach.

8.2.1. Kolonie przypominające *C. m. subsp. sepedonicus* posiać na jedno z następujących podłoży: (receptura podana jest w dodatku 5):

agar odżywczy z glukozą (tylko do przeszczepiania),

agar drożdżowo-peptonowo-glukozowy,

agar mineralny z ekstraktem drożdżowym.

Inkubować w temp. 21–24 °C przez okres do 10 dni.



*C. m. subsp. sepedonicus* jest organizmem wolno rosnącym, zwykle wytwarza w ciągu 10 dni kremowe, wypukłe kolonie wielkości łebka od szpilki. (Zdjęcia typowych kolonii *C. m. subsp. Sepedonicus*, patrz na stronie internetowej <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

#### 8.2.2. Przeszczepianie w celu uzyskania czystej kultury.

Tempo wzrostu poprawia się przez przeszczepianie. Typowe kolonie są kremowo-białe, czasem żółte, zaokrąglone, gładkie, wzniesione, wypukłe, śluzowato-płynne, z całymi brzegami i zwykle mają średnicę od 1 do 3 mm.

Proste barwienie metodą Grama (dodatek 9) może pomóc wybrać kolonie do dalszych testów.

#### 8.2.3. Zidentyfikować podejrzane kolonie (patrz: część 9) i przeprowadzić test patogeniczności (patrz: część 10).

### 9. IDENTYFIKACJA

Identyfikować czyste kultury podejrzanych izolatów *C. m. subsp. sepedonicus*, stosując co najmniej dwa z poniższych testów, opartych na różnych zasadach biologicznych.

W przypadku każdego przeprowadzanego testu uwzględniać, tam, gdzie to możliwe, znane szczepy referencyjne.

#### 9.1. Testy identyfikacyjne – fizjologiczne i biochemiczne

Określić następujące właściwości fenotypowe, które powszechnie występują lub nie występują u *C. m. subsp. sepedonicus*, zgodnie z metodami opisanymi przez: Lelliott i Stead (1987), Klement *et al.* (1990), Schaad (2001), Anonymous (1987).

Wszystkie pożywki powinny być inkubowane w temp. 21 °C i poddane oględzinom po sześciu dniach. Jeśli nie nastąpił żaden wzrost, kontynuować inkubację przez okres do 20 dni.

Wszystkie testy muszą obejmować znaną kontrolę *C. m. subsp. sepedonicus*. Testy biochemiczne i fizjologiczne muszą być przeprowadzane przy użyciu inokulum z agaru odżywczego izolatów uzyskanych w procesie pasażowania. Porównania morfologiczne muszą być przeprowadzane na kulturach wyrosłych na agarze odżywczym z glukozą.

Testy	Oczekiwany wynik
Test oksydacyjno-fermentacyjny (O/F)	obojętny lub słabo utleniający
Aktywność oksydazy	–
Wzrost przy 37 °C	–
Aktywność ureazy	–
Hydrolyza eskuliny	+
Hydrolyza skrobi	– lub słaba
Tolerancja wobec 7 % NaCl	–
Produkcja indolu	–
Aktywność katalazy	+
Produkcja H <sub>2</sub> S	–
Wykorzystanie cytrynianu	–
Upłynnianie żelatyny	–
Kwas glicerolowy	–
Kwas z laktozy	– lub słaba
Kwas z ramnozy	–
Kwas z salicyny	–
Barwienie metodą Grama (dodatek 9)	+

**9.2. Test IF**

- a) Przygotować zawiesinę około  $10^6$  komórek na ml w buforze IF (dodatek 3).
- b) Przygotować serię dwukrotnych rozcieńczeń odpowiedniej surowicy.
- c) Zastosować procedurę IF (część 4).
- d) Wynik testu IF jest dodatni wtedy, kiedy miano kultury testowej jest takie samo jak miano kultury stanowiącej kontrolę pozytywną.

**9.3. Test PCR**

- a) Przygotować zawiesinę około  $10^6$  komórek na ml w ultraczystej wodzie (UPW).
- b) Podgrzewać 100  $\mu$ l zawiesiny komórek w zamkniętych probówkach w bloku grzejnym lub wrzącej łaźni wodnej przy temp. 100 °C przez cztery minuty. Jeśli to konieczne, w lizie komórek może pomóc dodanie do ostatecznego stężenia 0,05 M świeżo sporządzonego NaOH. Próbkę mogą być następnie przechowywane do momentu, kiedy będą potrzebne w temp. od -16 do -24 °C.
- c) Stosować odpowiednie procedury PCR w celu amplifikacji specyficznych dla *C. m. subsp. sepedonicus* ampliconów (np. Pastrik, 2000; patrz: dodatek 4; Li and de Boer, 1995; Mills *et al.*, 1997; Pastrik and Rainey, 1999; Schaad *et al.*, 1999).
- d) Pozytywna identyfikacja *C. m. subsp. sepedonicus* ma miejsce wtedy, gdy amplicony PCR są tej samej wielkości i wykazują ten sam polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych co szczep kontroli pozytywnej.

**9.4. Test FISH**

- a) Przygotować zawiesinę około  $10^6$  komórek na ml w UPW.
- b) Zastosować procedurę FISH (część 5).
- c) Test FISH daje pozytywny wynik, jeśli kultura i kontrola pozytywna dają te same reakcje.

**9.5. Analiza kwasów tłuszczowych (FAP)**

- a) Hodować kulturę na Trypticase Soy Agar (Oxoid) przez 72 godziny w temp. 21 °C (+/- 1°).
- b) Zastosować odpowiednią metodę FAP (Janse, 1991; Stead, 1992).
- c) Wynik FAP jest dodatni, jeśli profil podejrzonej kultury jest identyczny z profilem kontroli pozytywnej. Obecność charakterystycznych kwasów tłuszczowych: 15:1 Anteiso A, 15:0 Iso, 15:0 Anteiso, 16:0 Iso, 16:0 i 17:0 Anteiso często wskazuje na obecność *C. m. sepedonicus*. Inne bakterie, takie jak *Curtobacterium*, *Arthrobacter* i *Micrococcus*, również zawierają niektóre z tych kwasów, ale 15:1 Anteiso A jest rzadkim kwasem w tych bakteriach, a występuje we wszystkich *Clavibacter* spp. w ilości 1–5 %. W przypadku *C. m. sepedonicus* poziom ten jest zwykle zbliżony do 5 %.

**9.6. BOX-PCR**

- a) Przygotować zawiesinę około  $10^6$  komórek na ml w UPW.
- b) Przeprowadzić test zgodnie z procedurą (Smith *et al.*, 2001).

**10. TEST POTWIERDZAJĄCY**

Test patogeniczności musi zostać przeprowadzony w celu ostatecznego potwierdzenia diagnozy występowania *C. m. subsp. sepedonicus* oraz w celu oceny wirulencji kultur zidentyfikowanych jako *C. m. subsp. sepedonicus*:

- 10.1. Przygotować inokulum około  $10^6$  komórek na ml z trzydniowej kultury testowanego izolatu i odpowiedni szczep kontroli pozytywnej *C. m. subsp. sepedonicus*.



- 10.2. Inokulować 5–10 łodyg młodych siewek oberżyny w stadium trzeciego liścia (część 7.3 lub 7.4)
- 10.3. Inkubować w temperaturze 18–24 °C w warunkach dostatecznego oświetlenia i stosunkowo wysokiej wilgotności podlewając je tak, aby nie dopuścić do gromadzenia się wody lub wędnięcia z powodu niedoboru wody (patrz: 7.7). W przypadku czystych kultur typowe objawy wędnięcia uzyskuje się w okresie do 2 tygodni, lecz rośliny niewykazujące objawów po upływie tego czasu (patrz: 7.8) należy inkubować do 3 tygodni w temperaturze korzystnej dla uprawy oberżyny, ale nieprzekraczającej 25 °C (dodatek 8). Jeśli po 3 tygodniach objawy nie wystąpią, kultura nie może być uznana za patogeniczną formę *C.m. subsp. sepedonicum*.
- 10.4. Izolacji dokonywać z roślin wykazujących objawy przez pobranie dwucentymetrowego fragmentu łodygi powyżej miejsca inokulacji. Rozdrobnić i zawiesić w niewielkiej ilości sterylnej wody destylowanej lub 50 mM buforu fosforanowego (dodatek 3). Izolację z zawiesiny przeprowadzić przez posiew na MTNA i YPGA (dodatek 5), inkubację przez 3–5 dni w temp. 21–23 °C i obserwować tworzenie się kolonii typowych dla *C. m. subsp. sepedonicus*.

Dodatek 1

**Laboratoria uczestniczące w optymalizacji i weryfikacji protokołów**

Laboratorium <sup>(1)</sup>	Lokalizacja	Kraj
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Wiedeń i Linz	Austria
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Belgii
Plantedirektoratet	Lyngby	Dania
Central Science Laboratory	York	Anglia
Scottish Agricultural Science Agency	Edynburg	Szkocja
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	Francja
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Francja
State Laboratory	Dublin	Irlandia
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Germany
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Germany
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Niderlandy
Norwegian Crop Research Institute, Plant Protection Centre	Aas	Norwegia
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lizbona	Portugalia
Nacionalni institut za biologijo	Lubljana	Słowenia
Centro de Diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	Hiszpania

<sup>(1)</sup> Badacze, z którymi można się kontaktować: patrz strona internetowa <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

## Dodatek 2

**Przygotowanie kontroli pozytywnych i negatywnych do testów przesiewowych PCR/IF i FISH**

Przygotować 72-godziną kulturę wirulentnego szczepu *C. m. subsp. sepedonicus* [NCPBP 4053 lub PD 406] na podstawowej pożywce MTNA i zawiesić w 10 mM buforze fosforanowym, aby otrzymać gęstość komórek około  $1-2 \times 10^8$  cfu (jednostek tworzących kolonie) na ml. Uzyskuje się zwykle lekko mętną zawiesinę odpowiadającą gęstości optycznej 0,20 przy 600 nm.

Pobrać części przystolonowe z 200 bulw ziemniaków odmiany o białej skórce, o których wiadomo, że są wolne od *C. m. subsp. sepedonicus*.

Z pobranymi częściami przystolonowymi postępować jak zwykle i zawiesić osad w 10 ml.

Przygotować 10 sterylnych mikrofiolk 1,5 ml z 900  $\mu$ l zawieszonoego osadu.

Przenieść 100  $\mu$ l zawiesiny *C. m. subsp. sepedonicus* do pierwszej mikrofiolki. Zworteksować.

Ustalić dziesiętne poziomy porażenia przez dalsze rozcieńczanie w następnych pięciu mikrofiolkach.

Sześć porażonych mikrofiolk należy wykorzystać jako kontrolę pozytywną. Cztery nieporażone mikrofiolki należy wykorzystać jako kontrolę negatywną. Należy zaopatrzyć mikrofiolki w odpowiednie etykiety.

Rozdzielić uzyskane zawiesiny po 100  $\mu$ l do sterylnych 1,5 ml mikrofiolk otrzymując 9 powtórzeń każdego rozcieńczenia. Przechowywać w temp. – 16 do – 24 °C do chwili użycia.

Obecność i liczebność *C. m. subsp. sepedonicus* w próbach kontrolnych należy najpierw potwierdzić przez test IF.

W przypadku testu PCR dla każdej serii prób testowych dokonać ekstrakcji DNA z prób kontroli pozytywnej i negatywnej.

W przypadku testów IF i FISH dla każdej serii prób testowych przeprowadzić badania na próbach kontroli pozytywnej i negatywnej.

W przypadku testów IF, FISH i PCR *C. m. subsp. sepedonicus* musi zostać wykryty w przynajmniej  $10^6$  i  $10^4$  komórek/ml kontroli pozytywnej i nie wykryty w żadnej kontroli negatywnej.

---

## Dodatek 3

**Skład buforów i sposób ich przygotowania**

INFORMACJA OGÓLNA: Nieotwarte sterylne buforory mogą być przechowywane do jednego roku.

**1. Bufory do ekstrakcji****1.1. Bufor do ekstrakcji (50 mM bufor fosforanowy, pH 7,0)**

Bufor ten jest stosowany do ekstrakcji bakterii z tkanek rośliny przez homogenizację lub wytrząsanie.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (bezwodny)	4,26 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,72 g
Woda destylowana	1,00 L

Rozpuścić składniki, sprawdzić pH i przez 15 min sterylizować w autoklawie w temp. 121 °C.

Przydatne mogą być następujące dodatkowe składniki:

	Przeznaczenie	Ilość (na L)
Lubrol w płatkach	Deflokulant (*)	0,5 g
środek przeciwpieniący DC silicone	Środek przeciwpieniący (*)	1,0 ml
Pirofosforan czterosodowy	Przeciwutleniacz	1,0 g
Poliwinylopyrolidon-40 000 (PVP-40)	Wiązanie inhibitorów PCR	50 g

(\*) Do stosowania w przypadku metody homogenizacji ekstraktu.

**1.2. Bufor do zawieszania osadu (10 mM bufor fosforanowy, pH 7,2)**

Bufor ten jest stosowany do zawieszania i rozcieńczania ekstraktów z bulw ziemniaka po zagęszczeniu przez wirowanie.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	2,7 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,4 g
Woda destylowana	1,00 L

Rozpuścić składniki, sprawdzić pH i przez 15 min sterylizować w autoklawie w temp. 121 °C.

**2. Bufory do testu IF****2.1. Bufor IF (10 mM bufor fosforanowy (PBS), pH 7,2)**

Bufor jest używany do rozpuszczania przeciwciał.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	2,7 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,4 g
NaCl	8,0 g
Woda destylowana	1,0 L

Rozpuścić składniki, sprawdzić pH i przez 15 min sterylizować w autoklawie w temp. 121 °C.

## 2.2. Bufor IF-Tween

Bufor ten jest stosowany do płukania szkiełek.

Dodać 0,1 % Tween 20 do buforu IF.

## 2.3. Bufor fosforanowo-glicerynowy, pH 7,6

Bufor ten jest dodawany na okienka szkiełek IF, aby zwiększyć efekt fluorescencji.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	3,2 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,15 g
Gliceryna	50 ml
Woda destylowana	100 ml

Roztwory utrwalające o działaniu przeciwdobarwiającym są dostępne w handlu, np. Vectashield<sup>®</sup> (Vector Laboratories) lub Citifluor<sup>®</sup> (Leica).

---

### Dodatek 4

#### Określenie poziomu kontaminacji w testach IF i FISH

1. Określić średnią liczbę typowych fluoryzujących komórek w polu widzenia (c).
2. Określić liczbę typowych fluoryzujących komórek w okienku (C).

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

gdzie S = powierzchnia okienka szkiełka wielopunktowego, a

s = pole powierzchni obiektu:

$$s = \pi^2/4G^2K^2 \quad \text{gdzie} \quad i = \text{współczynnik pola (zależy od typu okularu i zawiera się w granicach od 8 do 24)}$$

K = współczynnik tubusa (1 lub 1,25)

G = powiększenie obiektu (100x, 40x, itd.).

3. Określić liczbę typowych komórek fluoryzujących na ml zawieszonego osadu (N)

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

gdzie y = objętość osadu naniesionego na każde z okienek, oraz

F = rozcieńczenie zawieszonego osadu.

---

## Dodatek 5

**Podłoża do izolacji i hodowli *C. m. subsp. sepedonicus***a) *Ogólne podłoża wzrostowe*

## Agar odżywczy (NA)

Nutrient Agar (Difco)	23,0 g
Woda destylowana	1,0 L

Rozpuścić składniki i sterylizować przez 15 min w autoklawie w temp. 121 °C.

## Agar odżywczy z glukozą (NDA)

Agar odżywczy z glukozą (prod. Difco) zawierający 1 % D(+) glukozy (monohydrat). Sterylizować w autoklawie w temperaturze 115 °C przez 20 minut.

## Agar drożdżowo-peptonowo-glukozowy (YPGA)

Yeast extract (Difco)	5,0 g
Bacto-Peptone (Difco)	5,0 g
D(+) glukoza (monohydrat)	10,0 g
Bacto-Agar (Difco)	15,0 g
Woda destylowana	1,0 L

Rozpuścić składniki i sterylizować przez 15 min w autoklawie w temp. 121 °C.

## Pożywka mineralna z wyciągiem drożdżowym (YGM)

Bacto-Yeast-Extract (Difco)	2,0 g
D(+) glukoza (monohydrat)	2,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,25 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,25 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1 g
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,015 g
NaCl	0,05 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,005 g
Bacto-Agar (Difco)	18 g
Woda destylowana	1,0 L

Rozpuścić składniki a pożywkę o objętości 0,5 litra sterylizować w autoklawie w temperaturze 115 °C przez 20 minut.

b) *Zatwierdzone selektywne podłoża wzrostowe*

## Podłoże MTNA

Jeśli nie zaznaczono inaczej, wszystkie komponenty pochodzą z BDH.

Yeast extract (Difco)	2,0 g
Mannitol	2,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,25 g

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,25 g
NaCl	0,05 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,015 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,005 g
Agar (Oxoid nr. 1)	16,0 g
Woda destylowana	1,0 L

Rozpuścić składniki, ustalić pH na 7,2. Po autoklawowaniu (w temp. 121 °C przez 15 minut) i ochłodzeniu do 50 °C, dodać antybiotyki: trimethoprim 0,06 g, kwas nalidyksowy 0,002 g, amphotericin B 0,01 g.

Podstawowy roztwór antybiotyków: trimethoprim (Sigma) i kwas nalidyksowy (Sigma) (oba w stężeniu 5 mg/ml), w 96 % metanolu, amphotericin B (Sigma) (1mg/ml) w sulfotlenku dimetylu. Roztwory podstawowe są sterylizowane na filtrze.

*Uwaga:*

Trwałość podstawowego podłoża wynosi trzy miesiące. Po dodaniu antybiotyków przy przechowywaniu w lodówce trwałość wynosi jeden miesiąc.

Podłoże NCP-88

Nutrient agar (Difco)	23 g
Yeast extract (Difco)	2 g
D-mannitol	5 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	2 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25 g
Woda destylowana	1,0 L

Rozpuścić składniki, ustalić pH na 7,2. Po autoklawowaniu i ochłodzeniu do 50 °C dodać następujące antybiotyki: Polymyxin B sulphate (Sigma) 0,003 g, kwas nalidyksowy (Sigma) 0,008 g, Cycloheximide (Sigma) 0,2 g.

Rozpuszczać antybiotyki w roztworach podstawowych w następujący sposób: kwas nalidyksowy w 0,01 M NaOH, cycloheximide w 50 % etanolu, polymyxin B sulphate w wodzie destylowanej. Roztwory podstawowe są sterylizowane na filtrze.

*Uwaga:*

Trwałość podstawowego podłoża wynosi trzy miesiące. Po dodaniu antybiotyków przy przechowywaniu w lodówce trwałość wynosi jeden miesiąc.

## Dodatek 6

**Zatwierdzony protokół badania metodą PCR i odczynniki****Uwaga:**

Wstępne testy powinny umożliwić powtarzalne wykrywanie co najmniej  $10^3$  do  $10^4$  komórek *C. m. sepedonicus* na ml ekstraktu próby.

Wstępne testy powinny także wykazać brak fałszywie dodatnich wyników z panelu wybranych szczepów bakteryjnych.

**1. Procedura wielokrotnego PCR z wewnętrzną kontrolą PCR (Pastrik, 2000)****1.1. Startery oligonukleotydowe**

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

Oczekiwana wielkość ampliconu z matrycy DNA *C. m. subsp. sepedonicus* = 502 bp (PSA-zestaw starterów).

Oczekiwana wielkość ampliconu z 18S rRNA wewnętrznej kontroli PCR = 377 bp (NS-zestaw starterów).

**1.2. Mieszanina do reakcji PCR**

Odczynnik	Ilość na reakcję	Stężenie końcowe
Sterylna UPW	15,725 µl	
10x bufor PCR <sup>(1)</sup> (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	2,5 µl	1x (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
BSA (frakcja V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
Mieszania d-NTP (20mM)	0,125 µl	0,1 mM
Starter PSA-1 (10µM)	0,5 µl	0,2 µM
Starter PSA-R (10µM)	0,5 µl	0,2 µM
Starter NS-7-F (10µM) <sup>(2)</sup>	0,1 µl	0,04 µM
Starter NS-8-R (10µM) <sup>(2)</sup>	0,1 µl	0,04 µM
Polimeraza Taq (5U/µl) <sup>(1)</sup>	0,2 µl	1,0 U
Objętość próbki	5,0 µl	
Całkowita objętość:	25,0 µl	

<sup>(1)</sup> Metody zostały zatwierdzone przy użyciu polimerazy Taq Perkin Elmer (AmpliQ lub Gold) i Gibco BRL.

<sup>(2)</sup> Stężenia starterów NS-7 F i NS-8-R zostały zoptymalizowane dla ekstraktów z części przystolonowych ziemniaków przy użyciu metody homogenizacji i oczyszczania DNA zgodnie z publikacją: Pastrik (2000) (patrz: część 6.1 a) i 6.2). Powtórna optymalizacja stężeń odczynników będzie wymagana, jeśli będzie zastosowana ekstrakcja przez wytrząsanie lub inne metody izolacji DNA.

**1.3. Warunki reakcji PCR**

Przeprowadzić następujący program:

1 cykl:	i)	3 minuty przy 95 °C (denaturacja matrycowego DNA)
10 cykli:	ii)	1 minuta przy 95 °C (denaturacja matrycowego DNA)
	iii)	1 minuta przy 64 °C (dołączanie starterów)
	iv)	1 minuta przy 72 °C (wydłużanie kopii)

25 cykli:	v)	30 sekund przy 95 °C (denaturacja matrycowego DNA)
	vi)	30 sekund przy 62 °C (dołączanie starterów)
	vii)	1 minuta przy 72 °C (wydłużanie kopii)
1 cykl:	viii)	5 minut przy 72 °C (ostateczne wydłużanie)
	ix)	zatrzymać przy 4 °C.

Uwaga:

Program ten jest zoptymalizowany do użytku z termocyklerem MJ Research PTC 200. W przypadku stosowania innych modeli może być konieczna modyfikacja czasu trwania etapów cykli ii), iii), iv), v), vi) oraz vii).

#### 1.4. Analiza amplikonu przy użyciu enzymu restrykcyjnego.

Produkty PCR ze zwielokrotnionego DNA *C. m. subsp. sepedonicus* dają po inkubacji w temp. 37 °C przez 30 minut charakterystyczny polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych uzyskanych za pomocą enzymu *Bgl* II. Fragmenty restrykcyjne uzyskane z *C. m. subsp. sepedonicus* mają wielkość 282 bp i 220 bp.

## 2. Przygotowywanie buforu obciążającego

### 2.1. Błękit bromofenolowy (10 % – roztwór podstawowy)

Błękit bromofenolowy	5 g
Woda destylowana (2x dest.)	50 ml

### 2.2. Bufor obciążający

Glicerol 86 %	3,5 ml
Błękit bromofenolowy(5.1)	300 µl
Woda destylowana (2x dest.)	6,2 ml

## 3. Bufor 10X Tris Acetate EDTA (TAE), pH 8.0

Bufor Tris	48,4 g
Kwas octowy lodowaty	11,42 ml
EDTA (sól dwusodowa)	3,72 g
Woda destylowana	1,00 L

Rozcieńczyć do 1x przed użyciem.

Dostępny także w handlu (np. Invitrogen lub odpowiednik).

---



## Dodatek 7

**Zatwierdzone odczynniki do testu FISH****1. Sondy oligonukleotydowe**

Sonda specyficzna dla *Cms* CMS-CY3-01: 5'- ttg cgg ggc gca cat ctc tgc acg -3'

Niespecyficzna sonda eubakteryjna EUB-338-FITC: 5'- gct gcc tcc cgt agg agt-3'

**2. Roztwór utrwalający**

[UWAGA! ŚRODEK UTRWALAJĄCY ZAWIERA PARAFORMALDEHYD, KTÓRY JEST TOKSYCZNY. NALEŻY ZAKŁADAĆ RĘKAWICE I NIE WDYCHAĆ. ZALECA SIĘ PRACĘ POD WYCIĄGIEM]

i) Ogrzać 9 ml wody klasy stosowanej w biologii molekularnej (np. ultraczysta woda (UPW)) do około 60 °C i dodać 0,4 g paraformaldehydu. Paraformaldehyd rozpuszcza się po dodaniu pięciu kropli 1N NaOH i wymieszaniu na mieszadło magnetycznym.

ii) Ustalić pH na 7,0 przez dodanie 1 ml 0.1 M buforu fosforanowego (PB; pH 7,0) oraz 5 kropli 1N HCl. Sprawdzić pH papierkiem lakmusowym i dostosować, jeśli trzeba, za pomocą HCl lub NaOH.

[UWAGA! NIE STOSOWAĆ PH-METRU DO ROZTWORÓW ZAWIERAJĄCYCH PARAFORMALDEHYD]

iii) Przechowywać roztwór przez filtr membranowy 0,22 µm i przechowywać do czasu użycia w temp. 4 °C, zabezpieczony przed kurzem.

iv) Uwaga:

Alternatywny roztwór utrwalający: 96 % etanol.

**3. 3x Hybmix**

NaCl 2,7 M

Tris-HCl 60 mM (pH 7,4)

EDTA (sterylizowany na filtrze i autoklawowany) 15 mM

Rozcieńczyć do 1x, jak wymagane.

**4. Roztwór do hybrydyzacji**

1x Hybmix

Siarczan dodecyłu sodu (SDS) 0,01 %

sonda EUB 338 5 ng/µl

sonda CMSCY301 5 ng/µl

Przygotować objętości roztworu do hybrydyzacji zgodnie z obliczeniami w tabeli 1. Dla każdego szkiełka (zawierającego dwie różne próby w powtórzeniu) potrzebnych jest 90 µl roztworu do hybrydyzacji.

Tabela: Zalecane ilości do przygotowania mieszaniny do hybrydyzacji

	2 szkiełka	8 szkiełek
Sterylna UPW	50,1	200,4
3x hybmix	30,0	120,0
1 % SDS	0,9	3,6
Sonda EUB 338 (100 ng/µl)	4,5	18,0
Sonda CMSCY301 (100 ng/µl)	4,5	18,0
Całkowita objętość (µl)	90,0	360,0

Uwaga: Przechowywać wszystkie roztwory zawierające wrażliwe na światło sondy oligonukleotydowe w ciemności, w temperaturze - 20 °C. W czasie stosowania chronić przed bezpośrednim światłem słonecznym lub światłem elektrycznym.

**5. 0,1M bufor fosforanowy, pH 7,0**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,52 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,44 g
Woda destylowana	1,00 L

Rozpuścić składniki, sprawdzić pH i przez 15 min sterylizować w autoklawie w temp. 121 °C.

---

**Dodatek 8****Hodowla oberżyny**

Nasiona oberżyny (*Solanum melongena*) wysiać do pasteryzowanego kompostu stosowanego dla nasion. Siewki z pełni rozwiniętymi liśćmi (od 10 do 14 dni) przesadzić do pasteryzowanego kompostu doniczkowego.

Rośliny oberżyny powinny być hodowane w szklarni w następujących warunkach środowiskowych:

Długość dnia		14 godzin lub naturalna długość dnia, w przypadku dnia dłuższego;
Temperatura	dzień	21 do 24 °C,
	noc	15 °C.

Wrażliwe odmiany oberżyny: „Black Beauty”,  
„Long Tom”,  
„Rima”,  
„Balsas”.

Dostawca: patrz strona internetowa <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

---

## Dodatek 9

**Metoda barwienia Grama (Modyfikacja Huckera) (Doetsch, 1981) <sup>(1)</sup>***Roztwór fioletu krystalicznego*

2 g fioletu krystalicznego rozpuścić w 20 ml 95 % etanolu

0,8 g szczawianu amonu rozpuścić w 80 ml wody destylowanej

Wymieszać oba roztwory.

*Płyn Lugola*

Jod 1 g

Jodek potasu 2 g

Woda destylowana 300 ml

Substancje stałe rozdrobnić razem w moździerzu. Dodać wodę i wymieszać w zamkniętym pojemniku.

*Roztwór barwnika kontrastowego – safraniny*

Roztwór podstawowy:

Safranina O 2,5 g

95 % etanol 100 ml

Zmieszać i przechowywać.

Rozcieńczyć: W celu uzyskania roztworu roboczego rozcieńczyć w stosunku 1:10.

*Proces barwienia*

1. Przygotować rozmaz, wysuszyć na powietrzu i utrwalić termicznie.
2. Preparat zalać fioletem krystalicznym na jedną minutę.
3. Szybko przepłukać wodą z kranu.
4. Zalać płynem Lugola na jedną minutę.
5. Przepłukać wodą z kranu i osuszyć bibułą.
6. Odbarwiać 95 % alkoholem etylowym dodawanym kroplami aż do momentu, gdy rozmaz przestanie uwalniać barwnik, lub zanurzyć w alkoholu na 30 sekund, lekko poruszając preparatem.
7. Przepłukać wodą z kranu i osuszyć bibułą.
8. Zalać roztworem safraniny na 10 sekund.
9. Przepłukać wodą z kranu i osuszyć bibułą.

Bakterie gramodatnie barwią na kolor niebiesko-fioletowy; bakterie gramujemne barwią na kolor różowo-czerwony.

(<sup>1</sup>) Można również zastosować dostępne w handlu roztwory i zestawy do barwienia.

## BIBLIOGRAFIA

1. Anonymous, 1987. Scheme of the detection and diagnosis of the ring rot bacterium *Corynebacterium sepedonicum* in batches of potato tubers. Komisja Wspólnot Europejskich, Luksemburg. Publ EUR 11 288 EN, 21 pp.
2. Bradbury, J. F., 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. Rev. Pl. Path., 49, 213–218.
3. Dinesen, I. G., 1984. The extraction and diagnosis of *Corynebacterium sepedonicum* from diseased potato tubers. EPPO Bull. 14 (2), 147–152.
4. Doetsch, R. N., 1981. Determinative methods of light microscopy. W: Manual of methods for general bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, 21–23.
5. Hugh, R. and Leifson, F., 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. J. Bact., 66, 24–26.
6. Janse, J. D., 1991. Infra- and intra-specific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty-acid analysis. Systematic and Applied Microbiology 14; 335–345.
7. Janse, J. D. and J. Van Vaerenbergh. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (*Corynebacterium sepedonicum*) in potato. EPPO Bull. 17 (1987), 1–10.
8. Jansing, H. and K. Rudolph, 1998. Physiological capabilities of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* and development of a semi-selective medium. Journal of Plant Diseases and Protection, 105, 590–601.
9. Kovacs, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature, Lond., 178, 703.
10. Klement Z.; Rudolph, K and D. C. Sands, 1990. Methods in Phytobacteriology. Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 pp.
11. Lelliott, R. A., 1966. The plant pathogenic coryneform bacteria. J. appl. Bact., 29, 114–118.
12. Lelliott, R. A., E. Billing and A. C. Hayward, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads J. appl. Bact., 29, 470–489.
13. Lelliott, R. A. and P. W., Sellar, 1976. The detection of latent ring rot (*Corynebacterium sepedonicum* (Spiek. et Koth.) Skapt. et Burkh.) in potato stocks. EPPO Bull. 6 (2), 101–106.
14. Li, X. and S.H. de Boer, 1995. Selection of Polymerase Chain Reaction primers from RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Phytopathology, 85, 837–842.
15. Mills, D., Russell, B., W. and J., W. Hanus, 1997. Specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* by amplification of three unique DNA sequences isolated by subtraction hybridization. Phytopathology, 87, 8, 853–861.
16. Pastrok, K.-H. and R.A. Rainey. 1999. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. J. Phytopathology 147; 687–693.
17. Pastrok, K.-H., 2000. Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. European Journal of Plant Pathology, 106, 155–165.
18. Ramamurthi, C. S., 1959. Comparative studies on some Gram-positive phytopathogenic bacteria and their relationship to the Corynebacteria. Mem. Cornell agric. Exp. Sta., 366, 52 pp.
19. Schaad, W., Berthier-Schaad, Y., Sechler, A. and Knorr, D. (1999) Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system. Plant Disease 83; 1095–1100.
20. Schaad, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Schaad [Hrsg.]. — 3. ed.; St. Paul, Minnesota; 373 pp.
21. Skerman, V. B. D., 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria. 2nd ed., William and Wilkins Company, Baltimore.
22. Smith, N. C.; Hennesy, J; Stead, D.E., 2001. Repetitive sequence-derived PCR profiling using the BOX-A1/*Ralstonia solanacearum* primer for rapid identification of plant pathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. European Journal of Plant Pathology, 107 (7), 739–748.
23. Sneath, P. H. A. and V. G. Collins, 1974. A study in test reproductibility between laboratories: report of *Pseudomonas* working party. Antonie van Leeuwenhoek, 40, 481–527.
24. Stead, D.E. 1992. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty-acid profiles. International Journal of Systematic Bacteriology 42; 281–295.
25. Wullings, B. A.; van Beuningen, A. R.; Janse, J. D. and A. D. L. Akkermans, 1998. Detection of *Ralstonia solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent *in situ* hybridization with 23s rRNA-targeted probes. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4546–4554.

## ZAŁĄCZNIK II

1. Dla każdego podejrzanego wystąpienia, w odniesieniu do którego uzyskano pozytywne wyniki testu(-ów) przesiewowych, zgodnie z metodą wymienioną w załączniku I, i dla którego oczekuje się potwierdzenia lub wykluczenia tego wyniku po zakończeniu wszystkich badań według opisanej metody, należy zachować i odpowiednio przechowywać:

- wszystkie testowane bulwy oraz, w miarę możliwości, próby roślin,
- wszelkie pozostałe ekstrakty oraz dodatkowe materiały przygotowane do testów przesiewowych, np. szkiełka do immunofluorescencji,

oraz

- wszelkie stosowne dokumenty,

aż do zakończenia opisywanych badań.

Zachowanie bulw umożliwi przeprowadzenie testów odmian, w przypadkach gdzie uzna się to za właściwe.

2. W przypadku potwierdzenia wystąpienia organizmu należy zachować i we właściwy sposób zabezpieczyć:

- materiał określony w ust. 1,

oraz

- próbę porażonego materiału roślinnego oberżyny, zainokulowanego ekstraktem z bulwy lub z rośliny,

oraz

- kulturę wyizolowanego organizmu,

przez co najmniej jeden miesiąc po procedurze powiadomienia, zgodnie z art. 5 ust. 2.

—

## ZAŁĄCZNIK III

1. Elementy brane pod uwagę przy ustalaniu zasięgu prawdopodobnego porażenia, zgodnie z art. 5 ust. 1 lit. b), obejmują:
  - bulwy lub rośliny w miejscu produkcji określonym jako porażone, zgodnie z art. 5 ust. 1 lit. a),
  - miejsce(-a) produkcji związane z produkcją bulw lub roślin, określonych jako porażone zgodnie z art. 5 ust. 1 lit. a), łącznie z tymi miejscami, w których wykorzystuje się to samo urządzenia i sprzęt do produkcji, bezpośrednio lub poprzez wspólnych kontrahentów,
  - bulwy lub rośliny produkowane w miejscu(-ach) określonym(-ych) w poprzednim tiret lub występujące w takim miejscu(-ach) produkcji w okresie, gdy bulwy lub rośliny, określone jako porażone zgodnie z art. 5 ust. 1 lit. a), występowały w miejscach produkcji określonych w tiret pierwszym,
  - obiekty, w których znajdowały się ziemniaki pochodzące z miejsc produkcji, o których mowa w tiret wymienionych powyżej,
  - wszystkie maszyny, pojazdy, statki, składy lub ich jednostki oraz wszelkie inne przedmioty, łącznie z opakowaniami, które mogły mieć kontakt z bulwami czy roślinami określonymi jako porażone zgodnie z art. 5 ust. 1 lit. a),
  - wszelkie bulwy lub rośliny składowane lub mające kontakt z jakimikolwiek obiektami lub przedmiotami wymienionymi w poprzednim tiret, przed oczyszczeniem i dezynfekcją tych obiektów i przedmiotów,
  - obejmują, jako wynik analizy prowadzonej na mocy art. 6, bulwy lub rośliny mające siostrzane lub rodzicielskie powiązania klonalne z bulwami lub roślinami określonymi jako porażone zgodnie z art. 5 ust. 1 lit. a) i w odniesieniu do których badania wskazują na prawdopodobieństwo wystąpienia porażenia na drodze dziedziczenia (powiązań klonalnych), choć wyniki testów na obecność organizmu wykazały wynik negatywny. Mogą zostać podjęte badania odmiany, mające na celu weryfikację pochodzenia porażonych lub powiązanych poprzez rozmnożenia klonalne bulw lub roślin,

oraz

  - miejsce(-a) produkcji bulw lub roślin, o których mowa w poprzednim tiret.
2. Elementy brane pod uwagę przy określaniu zasięgu możliwego rozprzestrzenienia się, zgodnie z art. 5 ust. 1 lit. c), obejmują:
  - bliskość innych miejsc produkcji, gdzie uprawia się ziemniaki lub inne rośliny żywicielskie,
  - wspólność produkcji i wykorzystywania posiadanych zapasów sadzoniaków ziemniaka.
3. Szczegóły powiadomienia określone w art. 5 ust. 2 akapit pierwszy, obejmują:
  - niezwłocznie po potwierdzeniu obecności organizmu w rezultacie testów laboratoryjnych, przy zastosowaniu metod wyszczególnionych w załączniku I, co najmniej:
    - nazwę odmiany ziemniaków w partii,
    - typ (ziemniaki inne niż przeznaczone do sadzenia, sadzoniaki itd.) oraz, tam, gdzie ma to zastosowanie, kategorię,
  - w przypadku gdy istnieje niebezpieczeństwo porażenia ziemniaków otrzymanych z lub przesłanych do innego(-ych) państwa(-stw) członkowskiego(-ich), państwo członkowskie, na którego terenie stwierdzono porażenie, niezwłocznie przekazuje zainteresowanemu państwu(-om) członkowskiemu(-im) informacje umożliwiające zastosowanie się do ustaleń art. 5 ust. 3, a zawierające:
    - nazwę odmiany ziemniaków w partii,
    - nazwę i adres odbiorcy i nadawcy,
    - datę dostawy partii ziemniaków,

- wielkość dostarczonej partii ziemniaków,
- kopię paszportu roślin lub co najmniej numer paszportu roślin tam, gdzie ma to zastosowanie, oraz numer rejestracyjny producenta lub handlowca, tam, gdzie ma to zastosowanie, oraz kopię dokumentu dostawczego.

Komisja jest powiadamiana niezwłocznie o przekazaniu takich informacji.

- Po zakończeniu wszystkich badań, w każdym przypadku:
    - datę potwierdzenia porażenia,
    - krótki opis badań przeprowadzonych w celu identyfikacji źródła pochodzenia porażenia i zasięgu możliwego jego rozprzestrzeniania się, łącznie z informacją o poziomie wykonanego próbobrania,
    - informacje o zidentyfikowanych lub podejrzewanych źródłach pochodzenia porażenia,
    - szczegółowe informacje o zasięgu porażenia, w tym o liczbie miejsc produkcji i liczbie partii z określeniem odmiany, oraz, w przypadku sadzeniaków, kategorii,
    - szczegółowe dane o wyznaczonej strefie, wraz z liczbą miejsc produkcji nieuznanych za porażone, ale objętych strefą,
    - inne informacje mające związek z potwierdzonym porażeniem, jakich może wymagać Komisja.
-

## ZAŁĄCZNIK IV

1. Urzędowo kontrolowane środki, o których mowa w art. 7 ust. 1, obejmują:
  - wykorzystanie jako pasze dla zwierząt po uprzedniej obróbce cieplnej, która zabezpieczy przed ryzykiem przeżycia organizmu,
  - lub
  - złożenie na urzędowo zatwierdzonym specjalnym składowisku odpadów, gdzie nie ma możliwości do zidentyfikowania ryzyka przedostania się czynnika chorobotwórczego do środowiska, np. poprzez przesączanie na użytki rolne,
  - lub
  - spalanie,
  - lub
  - wykorzystywanie w przetwórstwie przemysłowym poprzez bezpośrednie i niezwłoczne dostarczenie do zakładu przetwórczego posiadającego urzędowo zatwierdzone urządzenia do utylizacji odpadów, w odniesieniu do których stwierdzono, że nie ma możliwości do zidentyfikowania ryzyka rozprzestrzeniania się organizmu, oraz wyposażonego w system oczyszczania i dezynfekcji przynajmniej pojazdów opuszczających obiekt,
  - lub
  - inne środki, pod warunkiem ustalenia, że nie istnieje możliwe do zidentyfikowania ryzyko rozprzestrzeniania organizmu; o tych środkach, wraz z ich uzasadnieniem, należy powiadamiać Komisję i inne państwa członkowskie.

Jakiegokolwiek pozostałe odpady powstałe w trakcie i w wyniku wyżej opisanych działań należy utylizować za pomocą urzędowo zatwierdzonych metod, zgodnie z załącznikiem V do niniejszej dyrektywy.

2. Właściwe wykorzystanie lub usuwanie bulw czy roślin określonych jako prawdopodobnie porażone, zgodnie z art. 5 ust. 1 lit. b), i określonych w art. 7 ust. 2, pod kontrolą odpowiedzialnych organów urzędowych zainteresowanych państw członkowskich, przy zapewnieniu właściwej komunikacji pomiędzy tymi organami, w celu utrzymania stałego poziomu kontroli oraz przy akceptacji właściwych organów urzędowych państwa członkowskiego, na terenie którego ziemniaki mają być pakowane lub przetwarzane, w związku z wymienionymi w pierwszym i drugim tiret urządzeniami do usuwania odpadów, obejmuje:
  - wykorzystanie jako ziemniaki przeznaczone do konsumpcji, pakowane jako gotowe do bezpośredniego dostarczenia i użycia bez przepakowywania, w miejscu wyposażonym w odpowiednie urządzenia do utylizowania odpadów. Ziemniaki przeznaczone do sadzenia mogą być przetwarzane w tym samym miejscu tylko wówczas, gdy odbywa się to oddzielnie lub po oczyszczeniu i dezynfekcji,
  - lub
  - wykorzystanie jako ziemniaki przeznaczone do przetwórstwa przemysłowego i przeznaczone do bezpośredniej i niezwłocznej dostawy do zakładu przetwórczego posiadającego właściwe urządzenia do utylizowania odpadów oraz system oczyszczania i dezynfekcji przynajmniej pojazdów opuszczających zakład,
  - lub
  - inne sposoby wykorzystania lub usunięcia, pod warunkiem braku możliwości do zidentyfikowania ryzyka rozprzestrzeniania się organizmu i w przypadku uzyskania akceptacji właściwych organów urzędowych, o których mowa powyżej.

3. Za właściwe metody czyszczenia i dezynfekcji przedmiotów określonych w art. 7 ust. 3 uznaje się te, w odniesieniu do których stwierdzono, że nie istnieje możliwe do zidentyfikowania ryzyka rozprzestrzeniania się organizmu, oraz które są stosowane pod nadzorem odpowiedzialnych organów urzędowych państw członkowskich.



4. Środki wprowadzone przez państwa członkowskie w ramach wytyczonej strefy, ustanowionej zgodnie z art. 5 ust. 1 lit. c) i określonej w art. 7 ust. 4, obejmują:

4.1. W miejscach produkcji określonych jako porażone, zgodnie z art. 5 ust. 1 lit. a):

- a) na polu określonym jako porażone, zgodnie z art. 5 ust. 1 lit. a), albo
- i) — podczas co najmniej trzech lat uprawy następujących po roku, w którym stwierdzono porażenie,
- podejmuje się środki w celu wyeliminowania samosiewów roślin ziemniaka i innych występujących naturalnie roślin żywicielskich organizmu,
  - oraz
  - nie należy sadzić żadnych bulw, roślin czy nasion ziemniaka ani innych występujących naturalnie roślin żywicielskich organizmu, ani upraw, co do których istnieje możliwe do identyfikacji ryzyko rozprzestrzenienia się organizmu,
  - w pierwszym sezonie uprawy ziemniaka, następującym po okresie określonym w poprzednim tiret i pod warunkiem że w wyniku urzędowych inspekcji przez dwa kolejne sezony wegetacyjne poprzedzające sadzenie stwierdzono, iż pole jest wolne od samosiewów roślin ziemniaka i innych naturalnie występujących roślin będących żywicielami organizmu, dozwolona jest wyłącznie produkcja ziemniaków innych niż przeznaczone do sadzenia, a pozyskane bulwy należy poddać testom zgodnie z procedurą szczegółowo opisaną w załączniku I,
  - w sezonie uprawy ziemniaka, następującym po określonym w poprzednim tiret oraz po zastosowaniu właściwego płodozmianu, który powinien trwać co najmniej dwa lata, jeśli planuje się uprawę sadzeniaków ziemniaka, można sadzić ziemniaki, zarówno z przeznaczeniem na sadzeniaki, jak i pozostałe ziemniaki. Należy również przeprowadzić urzędową kontrolę, jak określono w art. 2 ust. 1; albo
- ii) — podczas czterech lat uprawy następujących po roku, w którym stwierdzono porażenie,
- podejmuje się środki w celu wyeliminowania samosiewów roślin ziemniaka i innych występujących naturalnie roślin żywicielskich organizmu,
  - oraz
  - pole należy albo wyłączyć z uprawy, albo przeznaczyć na pastwisko trwałe, stosując często niskie koszenie lub intensywny wypas,
  - w pierwszym sezonie uprawy ziemniaka następującym po okresie określonym w poprzednim tiret, pod warunkiem że w wyniku urzędowych inspekcji przeprowadzanych co najmniej przez dwa kolejne sezony wegetacyjne poprzedzające sadzenie stwierdzono, iż pole jest wolne od samosiewów roślin ziemniaka i innych naturalnie występujących roślin żywicielskich organizmu, można zezwolić na produkcję ziemniaków na sadzeniaki lub pozostałych ziemniaków, a zebrane bulwy należy poddać testom zgodnie z procedurą szczegółowo opisaną w załączniku I;
- b) na wszystkich pozostałych polach porażonego miejsca produkcji oraz pod warunkiem że właściwe organy urzędowe stwierdzą, że wyeliminowane zostało ryzyko występowania samosiewów roślin ziemniaka i innych naturalnie występujących roślin żywicielskich organizmu:
- w roku uprawy następującym po roku, w którym wykryto porażenie, albo nie uprawia się bulw ziemniaka, roślin ani nasion ziemniaka, ani innych występujących naturalnie roślin żywicielskich organizmu, albo
  - można sadzić kwalifikowane sadzeniaki ziemniaka, wyłącznie z przeznaczeniem na ziemniaki inne niż do sadzenia,
  - w drugim roku uprawy następującym po roku, w którym wykryto porażenie, do celów produkcji sadzeniaków ziemniaka lub pozostałych ziemniaków, można sadzić wyłącznie kwalifikowane sadzeniaki ziemniaka lub ziemniaki urzędowo przebadane pod kątem niewystępowania bakteriozy pierścieniowej i wyprodukowane pod urzędową kontrolą w miejscach produkcji innych niż wymienione w pkt 4.1,
  - co najmniej w trzecim roku uprawy następującym po roku stwierdzenia porażenia należy sadzić do celów produkcji sadzeniaków ziemniaka lub pozostałych ziemniaków wyłącznie kwalifikowane sadzeniaki ziemniaka lub ziemniaki wyprodukowane pod urzędową kontrolą z kwalifikowanych sadzeniaków ziemniaka,

- w każdym roku uprawy określonym w poprzednich tiret podejmuje się środki w celu wyeliminowania samosiewów roślin ziemniaka i innych naturalnie występujących roślin żywicielskich organizmu, jeśli stwierdzi się ich obecność, ponadto na każdym polu ziemniaków przeprowadza się urzędowe badanie zbieranych ziemniaków zgodnie z procedurą opisaną w załączniku I,
  - c) niezwłocznie po określeniu porażenia, zgodnie z art. 5 ust. 1 lit. a), oraz po pierwszym, następującym bezpośrednio po nim roku uprawy należy odpowiednio oczyścić i zdezynfekować wszystkie maszyny i obiekty magazynowe w miejscu produkcji, związane z produkcją ziemniaka przy zastosowaniu właściwych metod określonych w pkt 3;
  - d) w tych systemach produkcji, gdzie możliwa jest całkowita wymiana podłoża uprawowego,
    - nie sadi się żadnych bulw, roślin ani nie wysiewa się nasion, dopóki jednostka produkcyjna nie zostanie poddana urzędowo nadzorowanym środkom w celu wyeliminowania organizmu i usunięcia wszelkich pozostałości roślin żywicielskich, łącznie z, co najmniej, całkowitą wymianą podłoża uprawowego oraz oczyszczeniem i dezynfekcją jednostki produkcyjnej i całego sprzętu, oraz po udzieleniu przez właściwe organy urzędowe zezwolenia na produkcję ziemniaka,
- oraz
- produkcja ziemniaka prowadzona jest przy wykorzystaniu kwalifikowanych sadzeniaków ziemniaka lub minibulw, lub mikroroślin pozyskanych z przebadanych źródeł.

4.2. W ramach wyznaczonej strefy, bez uszczerbku dla środków określonych w pkt 4.1, państwa członkowskie:

- a) niezwłocznie po stwierdzeniu porażenia wymagają czyszczenia i dezynfekcji wszystkich maszyn i obiektów magazynowych związanych z produkcją ziemniaka, w odpowiedni sposób i przy zastosowaniu właściwych metod, jak określono w pkt 3;
- b) niezwłocznie, i przez co najmniej trzy sezony po stwierdzeniu porażenia:
  - zapewniają nadzór sprawowany przez właściwe organy urzędowe nad obiektami, w których uprawia się, składa lub przetwarza bulwy ziemniaka, łącznie z obiektami, gdzie wykorzystywane są maszyny związane z ziemniakami,
  - wymagają sadzenia, w obrębie tej strefy, wyłącznie kwalifikowanych sadzeniaków ziemniaka lub ziemniaków wyprodukowanych pod urzędowym nadzorem oraz badania zbiorów sadzeniaków ziemniaka uprawianych w miejscach produkcji określonych jako miejsca prawdopodobnie porażone, zgodnie z art. 5 ust. 1 lit. b),
  - wymagają oddzielnego przetwarzania zebranych sadzeniaków ziemniaka i pozostałych ziemniaków we wszystkich obiektach w obrębie strefy lub stosowania systemu zabiegów oczyszczania i dezynfekcji, wykonywanych pomiędzy przetwarzaniem sadzeniaków ziemniaka i pozostałych ziemniaków,
  - przeprowadzają urzędowe kontrole, jak szczegółowo określono w art. 2 ust. 1;
- c) w miarę potrzeb ustanawiają program wymiany sadzeniaków ziemniaka w odpowiednim czasie.

## ZAŁĄCZNIK V

Urzędowo zatwierdzone metody utylizowania odpadów, określone w pkt 1 załącznika IV, spełniają następujące przepisy, zapobiegające rozprzestrzenianiu się danego organizmu:

- i) odpady z przetwórstwa przemysłowego ziemniaka (łącznie z odrzuconymi ziemniakami i obierzynami) oraz wszelkie inne stałe odpady związane z ziemniakami (łącznie z ziemią, kamieniami i innymi resztkami), powinny być utylizowane następująco:
- składowane na urzędowo zatwierdzonym specjalnym składowisku odpadów, gdzie nie istnieje możliwe do zidentyfikowania ryzyko przedostania się czynnika chorobotwórczego do środowiska, np. poprzez przesączanie na użytki rolne. Odpady należy przewozić bezpośrednio na miejsce składowania w sposób bezpieczny, zabezpieczający przed ryzykiem uwalniania się,
  - lub
  - spalone,
  - lub
  - poprzez zastosowanie innych środków, pod warunkiem że nie istnieje możliwe do zidentyfikowania ryzyko rozprzestrzeniania organizmu; Komisja i inne państwa członkowskie muszą być powiadomione o takich środkach;
- ii) odpady płynne: przed ich utylizacją, odpady płynne zawierające ciała stałe należy poddać filtracji lub sedymentacji, dla usunięcia tych ciał. Osad ten należy usuwać, jak określono w ppkt i).

Następnie odpady płynne należy:

- podgrzewać na całej objętości do temperatury co najmniej 60 °C przez co najmniej 30 minut przed ich utylizacją,
- lub
- za urzędową zgodą i pod urzędową kontrolą, usunąć w taki sposób, by nie zaistniało możliwe do zidentyfikowania ryzyko, że odpady te wejdą w kontakt z użytkami rolnymi. Komisja i pozostałe państwa członkowskie zostaną powiadomione szczegółowo o podjętych działaniach.

Rozwiązania opisane w niniejszym załączniku stosuje się również w odniesieniu do odpadów powstałych podczas przetwarzania, przewożenia i usuwania porażonych partii.

---