

## ДИРЕКТИВА 2006/56/ЕО НА КОМИСИЯТА

от 12 юни 2006 година

за изменение на приложенията към Директива 93/85/ЕИО на Съвета относно борбата с пръстеновидното гниене по картофите

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаване на Европейската общност,

като взе предвид Директива 93/85/ЕИО на Съвета от 4 октомври 1993 г.<sup>1</sup> относно борбата с пръстеновидното гниене по картофите, и по-специално член 12 от нея,

като има предвид, че:

(1) Един от важните организми, вредни за картофите, е *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis *et al.* ssp. *sepedonicus* (Spieckermann *et* Kotthoff) Davis *et al.* - патогенният причинител на болестта пръстеновидно гниене по картофите (наричан по-нататък „организмът“).

(2) Организмът все още се среща в някои части на Общността.

(3) Директива 93/85/ЕИО на Съвета установява подробните мерки, които трябва да се вземат в държавите-членки срещу организма, с цел да се локализира и спре разпространението му; да се предотврати появата и разпространяването му; а ако се открие, да се предотврати разпространението му и да се води борба с него с цел унищожаване.

(4) Оттогава насам има значително развитие в разбирането за биологията, процедурите за откриване и определяне на организма, още повече практическият опит, натрупан в борбата с организма, предполага преглед на някои технически разпоредби, свързани с мерките за борба.

(5) Като резултат от това развитие изглежда необходимо да се преразгледат и актуализират мерките, включени в приложенията към Директива 93/85/ЕИО.

(6) Що се касае до процедурите за откриване и определяне, са включени и наскоро разработени процедури като флуоресцентна хибридизация на място (FISH) и полимеразна верижна реакция (PCR), също както и подобрения на различни технически елементи на актуалната процедура за откриване и определяне.

---

<sup>1</sup> ОВ L 259, 18.10.1993 г., стр. 2.

(7) Що се касае до техническите елементи на контролните мерки, подобрени разпоредби са направени за: начина на съхранение на тествани проби с оглед да са гарантира проследяването на организма, елементите, необходими за да се определи степента на възможното заразяване, подробностите за нотифициране на всяка потвърдена поява на организма и на съответната заражена зона, мерките, които да са предприемат на местата за производство, обозначени като заразени и в демаркираните зони.

(8) Мерките, предвидени в настоящата директива, са в съответствие със становището на Постоянния фитосанитарен комитет,

ПРИЕ НАСТОЯЩАТА ДИРЕКТИВА:

#### *Член 1*

Приложенията към Директива 93/85/ЕИО се заменят със съответните текстове в приложението към настоящата директива.

#### *Член 2*

1. Държавите-членки приемат и публикуват не по-късно от 31 март 2007 г. законовите, подзаконовите и административните разпоредби, необходими, за да се съобразят с настоящата директива. Те незабавно съобщават на Комисията текста на тези разпоредби, както и таблица на съответствието между разпоредбите и настоящата директива.

Те прилагат тези разпоредби от 1 април 2007 г.

Когато държавите-членки приемат тези разпоредби, в тях се съдържа позоваване на настоящата директива или то се извършва при официалното им публикуване. Условието и редът на позоваване се определят от държавите-членки.

2. Държавите-членки съобщават незабавно на Комисията текста на основните разпоредби от националното законодателство, които те приемат в областта, уредена с настоящата директива.

#### *Член 3*

Настоящата директива влиза в сила на третия ден след публикуването ѝ в *Официален вестник на Европейския съюз*.

#### *Член 4*

Адресати на настоящата директива са държавите-членки.

Съставено в Брюксел на 12 юни 2006 година.

*За Комисията:*

**Markos KYPRIANOU**

ПРИЛОЖЕНИЕ I

**ТЕСТОВА СХЕМА ЗА ДИАГНОСТИКА, ОТКРИВАНЕ И ОПРЕДЕЛЯНЕ НА  
БАКТЕРИЯТА НА ПРЪСТЕНОВИДНОТО ГНИЕНЕ ПО КАРТОФИТЕ  
*CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* (Smith) Davis *et al.* ssp. *SEPEDONICUS*  
(Spieckermann et Kotthoff) Davis *et al.***

**ОБХВАТ НА ТЕСТОВАТА СХЕМА**

Настоящата схема описва различните процедури, включени в:

- i) диагностика на пръстеновидното гниене в картофени клубени и растения;
- ii) откриване на *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* в проби от картофени клубени и растения;
- iii) определяне на *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*C. m.* subsp. *sepedonicus*).

**ОБЩИ ПРИНЦИПИ**

Оптимизирани протоколи за различните методи, валидирани реактиви и подробности за приготвянето на тестовите и контролни материали са изложени в допълненията. Списък с лаборатории, които са били включени в оптимизирането и валидирането на протоколи, е изложен в допълнение 1.

Тъй като протоколите включват откриване на карантинен организъм и ще включват използване на живи култури от *C. m. subsp. sepedonicus* като контролни материали, ще бъде необходимо да се изпълняват процедурите при подходящи карантинни условия с адекватни съоръжения за унищожаване на отпадъците и при условията за подходящи разрешителни, издадени от официалните власти по растителна карантина.

Тестовите параметри трябва да осигурят последователно и възпроизводимо откриване на нива от *C. m. subsp. sepedonicus* в набора от прагове на избрани методи.

Прецизната подготовка на положителни контроли е задължителна.

Тестването съгласно необходимите прагове също предполага правилни настройки, поддръжка и калибриране на оборудването, внимателно боравене и предпазване от реактивите и всички мерки за предотвратяване на заразяване между пробите, например разделяне на положителните контроли от тестовите проби. Стандартите за контрол на качеството трябва да се прилагат за да се избегнат административни и други грешки, особено що се отнася до етикетването и документацията.

Предполагано наличие, описано в член 4, параграф 2 от Директива 93/85/ЕИО, предполага положителен резултат на диагностичните или скринингови тестове, извършени на една проба както е описано в диаграмите.

Ако първият скринингов тест (имунофлуоресцентен (IF) или PCR/FISH) е положителен, тогава се предполага заразяване с *Cms* и трябва да се направи втори скринингов тест. Ако вторият скринингов тест е положителен, тогава предположението е потвърдено (предполагано наличие) и тестването трябва да продължи по схемата. Ако вторият скринингов тест е отрицателен, тогава пробата се счита за незаразена с *Cms*.

Следователно положителният имунофлуоресцентен тест, упоменат в член 4, параграф 2, се определя от положителен имунофлуоресцентен (IF) резултат, потвърден от втори скринингов тест (PCR/FISH).

Потвърдено наличие, упоменато в член 5, параграф 1 от Директива 93/85/ЕИО, предполага изолиране и определяне на чиста култура от *C. m. subsp. sepedonicus* с потвърждение за патогенност

## 1. ПРЕДСТАВЯНЕ НА ДИАГРАМАТА ЗА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТ

### 1.1. Схема за откриване за диагностика на пръстеновидно гниене в картофени клубени и растения със симптоми на пръстеновидно гниене

Тестовата процедура е предназначена за картофени клубени и растения със симптоми типични или подозирани за пръстеновидно гниене. Тя включва бърз скрининг тест, изолиране на патогена от проводящата тъкан върху диагностична

среда и, в случай на положителен резултат, определяне на културата като *C. m. subsp. sepedonicus*.

\*\*\*[Please insert the diagram from the original and please replace the following text in English by its Bulgarian version

potato tuber(s) or potato plant(s) with symptoms suspected of ring rot → Картофени клубени или картофени растения с предполагаеми за пръстеновидно гниене симптоми

**RAPID DIAGNOSTIC TESTS → БЪРЗИ ДИАГНОСТИЧНИ ТЕСТОВЕ**

**CORE ISOLATION TEST → ТЕСТ С ИЗОЛИРАНЕ НА СЪРЦЕВИНА**

colonies with typical morphology → Колонии с типична морфология

**NO → НЕ**

*C. m. subsp. sepedonicus* not detected **sample not infected by *C. m. subsp. sepedonicus***  
→ Не е открит *C. m. subsp. sepedonicus*. **Пробата не е заразена с *C. m. subsp. sepedonicus***

**YES → ДА**

purify by subculturing → Пречистване чрез субкултури

**IDENTIFICATION TESTS → ИДЕНТИФИКАЦИОННИ ТЕСТОВЕ**

**PATHOGENICITY TEST → ТЕСТ ЗА ПАТОГЕННОСТ**

both tests confirm pure culture as *C. m. subsp. sepedonicus* → И двата теста потвърждават чистата култура като *C. m. subsp. sepedonicus*

**NO → НЕ**

**sample not infected by *C. m. subsp. sepedonicus*** → **Пробата не е заразена с *C. m. subsp. sepedonicus***

**YES → ДА**

**sample infected by *C. m. subsp. sepedonicus*** → **Пробата е заразена с *C. m. subsp. sepedonicus***\*\*\*

---

(<sup>1</sup>) Описание на симптомите е дадено в раздел 2.

(<sup>2</sup>) Подходящите тестове са:

- имунофлуоресцентен тест (раздел 4),
- PCR тест (раздел 6),
- FISH тест (раздел 5).

(<sup>3</sup>) Въпреки че изолирането на патогена от растителния материал с типични симптоми чрез разпределително разреждане е директно, отглеждането на културата може да отпадне от по-напредналите стадии на инфекция. Сапрофитните бактерии, които се развиват върху болната тъкан, могат да надраснат или да потиснат патогена върху изолационната среда. Следователно е препоръчително да се използват и селективни, и неселективни среди, за предпочитане MTNA тест (раздел 8) или биологичен тест (раздел 7).

(<sup>4</sup>) Описание на типичната морфология на колонията е дадено в раздел 8.

(<sup>5</sup>) Ако тестът за изолиране е отрицателен, но симптомите на болестта са типични, то изолирането трябва да бъде повторено.

(<sup>6</sup>) Достоверна идентификация на чиста култура *C. m. subsp. sepedonicus* се получава чрез използване на тестовете, изброени в раздел 9.

(<sup>7</sup>) Тестът за патогенност е описан в раздел 10.

## 1.2. Схема за откриване и определяне на *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* в проби от асимптоматични картофени клубени

### Принцип

Тестовата процедура е предназначена за откриване на латентна инфекция на картофени клубени. Положителен резултат от поне два скринингови теста, базирани на различни биологични принципи, трябва да бъде допълнен от изолиране на патогена; последвана от, в случай на изолиране на типични колонии, потвърждаване на чиста култура от *C. m. subsp. sepedonicus*. Положителният резултат от само един от скрининговите тестове не е достатъчен, за да се предполага пробата за евентуална зараза.

Скрининговите тестове и изолационните тестове трябва да позволят праг за откриване от  $10^3$  до  $10^4$  клетки/ml ресуспендирана утайка, включени като положителни контроли във всяка серия от тестове.

\*\*\*[Please insert the diagram from the original and please replace the following text in English by its Bulgarian version

sample of potato tubers → Проба от картофени клубени

extraction and concentration of the patogen → Екстракция и концентрация на патогена

**CORE SCREENING TESTS IF test/PCR test/FISH test → СКРИНИНГ ТЕСТОВЕ  
НА СЪРЦЕВИНАТА IF тест/PCR тест/FISH тест**

**first screening test → Първи скринингов тест**

**negative → отрицателен**

*C. m. subsp. sepedonicus* not detected **sample not infected by *C. m. subsp. sepedonicus***  
→ Не е открит *C. m. subsp. sepedonicus*. Пробата не е заразена с *C. m. subsp. sepedonicus*

**positive → положителен**

**second screening test → Втори скринингов тест**

**negative → отрицателен**

*C. m. subsp. sepedonicus* not detected **sample not infected by *C. m. subsp. sepedonicus***  
→ Не е открит *C. m. subsp. sepedonicus*. Пробата не е заразена с *C. m. subsp. sepedonicus*

**positive → положителен**

**selective isolation and bioassay → Селективно изолиране и биологичен тест**

colonies with typical morphology → Колонии с типична морфология

**NO → НЕ**

*C. m. subsp. sepedonicus* not detected **sample not infected by *C. m. subsp. sepedonicus***  
→ Не е открит *C. m. subsp. sepedonicus*. Пробата не е заразена с *C. m. subsp. sepedonicus*

**YES → ДА**

purify by subculture → Пречистване чрез субкултура

**IDENTIFICATION TESTS → ИДЕНТИФИКАЦИОННИ ТЕСТОВЕ**

**PATHOGENICITY TEST → ТЕСТ ЗА ПАТОГЕННОСТ**

both tests confirm pure culture as *C. m. subsp. sepedonicus* → И двата теста потвърждават чистата култура като *C. m. subsp. sepedonicus*

**NO → НЕ**

**sample not infected by *C. m. subsp. sepedonicus* → Пробата не е заразена с *C. m. subsp. sepedonicus***

**YES → ДА**

**sample infected by *C. m. subsp. sepedonicus* → Пробата е заразена с *C. m. subsp. sepedonicus*\*\*\***

(<sup>1</sup>) Стандартният размер на пробата е 200 клубена, въпреки че процедурата може да бъде използвана при по-малки проби, ако няма на разположение 200 клубена.

(<sup>2</sup>) Методите за екстракция и концентрация на патогена са описани в раздел 3.1.

(<sup>3</sup>) Ако поне два теста, базирани на различни биологични принципи, са положителни, трябва да се направи изолиране и потвърждаване. Направете поне един скринингов тест. Ако този тест е отрицателен, пробата се счита за отрицателна. В случай че тестът е положителен, се изисква втори или повече скринингови тестове, базирани на различни биологични тестове, за да се потвърди първият положителен резултат. Ако вторият или другите тестове са отрицателни, пробата се счита за отрицателна. Не са необходими по-нататъшни тестове.

(<sup>4</sup>) Имунофлуоресцентен (IF) тест.

Винаги използвайте положително тяло за IF скрининг, допълнителни моноклонални тела могат да осигурят повече специфичност (вж. раздел 4).

(<sup>5</sup>) PCR тест.

Използвайте подходящо валидирани за PCR реактиви и протоколи (вж. раздел 6).

(<sup>6</sup>) FISH тест.

Използвайте валидирани реактиви и протоколи (вж. раздел 5).

(<sup>7</sup>) Селективно изолиране.

С MTNA или NCP-88 среда и разтвор 1/100 от ресуспендираната утайка това е много подходящ метод за директно изолиране на *C. m. subsp. sepedonicus*. Типични колонии се получават от 3 до 5 дни след засаждане. След това патогенът може да бъде пречистен и идентифициран. За пълно изследване на потенциала му тестът изисква внимателна подготовка на конусчетата, за да се избягнат вторични бактерии, свързани с картофения клубен, които са конкуренти на *C. m. subsp. sepedonicus* върху средата и могат да се развият повече от патогена. Ако тестовете с блюдата се провалят, трябва да се направи изолиране от растения, използвани за биологичния тест (вж. раздел 5).

(<sup>8</sup>) Биологичният тест се използва за изолиране на *C. m. subsp. sepedonicus* от утайки от растителен екстракт чрез селективно обогатяване в патладжани (*Solanum melongena*). Тестът изисква оптимални условия на инкубация, както е определено в този метод. Инхибиторът за бактерии на *C. m. subsp. sepedonicus* на MTNA или NCP-88 среда най-вероятно няма да повлияе в този тест (вж. раздел 7).



(<sup>9</sup>) Типичната морфология на колонията е описана в раздел 8.

(<sup>10</sup>) Култивирането или биологичният тест могат да се провалят поради конкуренция или потискане от сапрофитни бактерии. Ако се получат положителни резултати при скрининговите тестове, но изолационните тестове са отрицателни, тогава повторете изолационните тестове от същата утайка или чрез вземане на допълнителна проводяща тъкан близо да конусчетата от разрязани клубени от същата проба и, ако е необходимо, тествайте допълнителните проби.

(<sup>11</sup>) Достоверна идентификация на чисти култури с предполагаем *C. m. subsp. sepedonicus* се получава, като се използват тестовете, описани в раздел 9.

(<sup>12</sup>) Тестът за патогенност е описан в раздел 10.

### 1.3. Схема за откриване и определяне на *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* в проби от асимптоматични картофени растения

\*\*\*[Please insert the diagram from the original and please replace the following text in English by its Bulgarian version

sample of stem segments → Проба от стъблени части

extraction and concentration of the pathogen → Екстракция и концентрация на патогена

**CORE SCREENING TESTS** selective isolation/IF test/PCR test/FISH test **optional auxiliary test:** bioassay → **СКРИНИНГ ТЕСТОВЕ НА СЪРЦЕВИНАТА** селективно изолиране/IF тест/PCR тест/FISH тест **незадължителен спомагателен тест:** биологичен

colonies with typical morphology after isolation → Колонии с типична морфология след изолиране

**all tests done negative** → **Всички тестове са отрицателни**

**NO** → **НЕ**

*C. m. subsp. sepedonicus* not detected **sample not infected by *C. m. subsp. sepedonicus*** → Не е открит *C. m. subsp. sepedonicus*. **Пробата не е заразена с *C. m. subsp. sepedonicus***

**YES** → **ДА**

purify by subculture → Пречистване чрез субкултура

**IDENTIFICATION TESTS** → **ИДЕНТИФИКАЦИОННИ ТЕСТОВЕ**

**PATHOGENICITY TEST** → **ТЕСТ ЗА ПАТОГЕННОСТ**

both tests confirm pure culture as *C. m. subsp. sepedonicus* → И двата теста потвърждават чистата култура като *C. m. subsp. sepedonicus*

**NO → НЕ**

**sample not infected by *C. m. subsp. sepedonicus* → Пробата не е заражена с *C. m. subsp. sepedonicus***

**YES → ДА**

**sample infected by *C. m. subsp. sepedonicus* → Пробата е заражена с *C. m. subsp. sepedonicus*\*\*\***

---

(<sup>1</sup>) Вж. раздел 3.2 за препоръчителните размери на пробата.

(<sup>2</sup>) Методите за екстракция и концентрация на патогена са описани в раздел 3.2.

(<sup>3</sup>) Ако поне два теста, базирани на различни биологични принципи, са положителни, трябва да се направи изолиране и потвърждаване. Направете поне един скринингов тест. Ако този тест е отрицателен, пробата се счита за отрицателна. В случай че тестът е положителен, се изисква втори или повече скринингови тестове, базирани на различни биологични тестове, за да се потвърди първият положителен резултат. Ако вторият или другите тестове са отрицателни, пробата се счита за отрицателна. Не са необходими по-нататъшни тестове.

(<sup>4</sup>) Тестът за селективно изолиране и типичната морфология на колонията са описани в раздел 8.

(<sup>5</sup>) Имунофлуоресцентният тест е описан в раздел 4.

(<sup>6</sup>) PCR тестовете са описани в раздел 6.

(<sup>7</sup>) FISH тестът е описан в раздел 5.

(<sup>8</sup>) Биологичният тест е описан в раздел 7.

(<sup>9</sup>) Култивирането или биологичният тест могат да се провалят поради конкуренция или потискане от сапрофитни бактерии. Ако се получат положителни резултати при скрининговите тестове, но изолационните тестове са отрицателни, тогава повторете изолационните тестове и, ако е необходимо, тествайте допълнителните проби.

(<sup>10</sup>) Достоверна идентификация на чисти култури с предполагаем *C. m. subsp. sepedonicus* се получава, като се използват тестовете, описани в раздел 9.

(<sup>11</sup>) Тестът за патогенност е описан в раздел 10.

## 2. ВИЗУАЛЕН ПРЕГЛЕД ЗА СИМПТОМИ НА ПРЪСТЕНОВИДНО ГНИЕНЕ

### 2.1. Картофени растения

При европейските климатични условия симптомите рядко се откриват на полето и често само в края на сезона. Още повече симптомите са често маскирани или повлияни от/объркани с/ други болести, остаряване или други механични повреди. Следователно може лесно да се пропуснат симптомите при инспекции на полето. Симптомите на спаружването са много различни от тези при кафявото гниене, спаружването обикновено е бавно и първоначално е ограничено до периферията на листата. Младите заразени листа често продължават да нарастват макар и по-бавно в заразените зони. Това създава листа със странни форми. Листата, засегнати от блокирането на проводящите тъкани по-надолу по стъблото, често развиват хлоротични, жълти до оранжеви интеркостални зони. Заразените листчета, листа и дори стъбла могат най-накрая да загинат. Често листата и клубените са просто с намален размер. Рядко растенията са недоразвити. Цветни снимки на обхвата от симптоми могат да бъдат намерени на интернет страницата <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

### 2.2. Картофени клубени

Най-ранните симптоми са лека стъкловидност или полупрозрачност на тъканта без омекване около проводящата система, особено близо до столоната. Проводящият пръстен на столоните може да е малко по-тъмен на цвят от обикновено. Първият лесно определен симптом е този, при който проводящият пръстен има жълтеникаво оцветяване и когато клубенът е изтискан нежно, струйки от подобна на сирене материя излизат от съдовете. Този ексудат съдържа милиони бактерии. Покафеняването на проводящата тъкан може да се развие и симптомите на клубените на този етап са подобни на тези на кафявото гниене, причинявано от *Ralstonia solanacearum*. Първоначално тези симптоми може да са ограничени до една част от пръстена, не задължително близо до столоните и могат постепенно да се разпрострат по целият пръстен. С напредването на инфекцията става разрушаване на проводящата тъкан; външната кора може да се отдели от вътрешната. При напредналите стадии на инфекцията се появяват пукнатини по повърхността на клубена, често те са червеникаво-кафяви по краищата. В последно време в Европа се появиха няколко случая, при които централната кора гние в същото време като проводящият пръстен, причиняващо вторична инвазия с вътрешно изкуфяване и некроза. Вторичната гъбна или бактериална инвазия може да маскира симптомите и да може да е трудно, и дори невъзможно да се различат симптомите на напреднало пръстеновидно гниене от друго гниене на клубените. Възможни са атипични симптоми. Цветни снимки на обхвата от симптоми могат да бъдат намерени на интернет страницата <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

## 3. ПРИГОТВЯНЕ НА ПРОБАТА

### 3.1. Картофени клубени

*Бележка:*

- Стандартният размер на пробата е 200 клубена на тест. По-интензивно пробовземане изисква повече тестове на проби с този размер. По-големият брой клубени в пробата ще доведе до потискане или трудно разбиране на резултатите. Въпреки това процедурата може за удобство да бъде приложена за проби с по-малко от 200 клубена, когато са налични по-малко клубени.
- Валидирането на всички методи за откриване, описани по-долу, е базирано на тестването на проби от по 200 клубена.
- Картофеният извлек, описан по-долу, може също да бъде използван за откриване на бактерията на кафявото гниене по картофите - *Ralstonia solanacearum*.

Незадължителна предварителна обработка преди приготвянето на пробата:

Измийте клубените. Използвайте подходящ дезинфектант (хлорна съставка, когато ще се използва PCR-тест, с оглед да се премахне ДНК на евентуален патоген и прахове за пране между всяка проба. Изсушете с въздух клубените. Тази процедура за измиване е особено полезна (но не е задължителна) за проби с много почва и ако ще се прави PCR-тест или директно изолиране.

3.1.1. Премахнете с чист и дезинфектиран скалпел или нож за зеленчуци кожата при столоните от всеки клубен, така че проводящата тъкан да стане видима. Внимателно изрежете малко сърцевина от проводящата тъкан при столоните и поддържайте количеството непроводяща тъкан минимално (вж. интернет страницата: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>)

*Бележка:*

Отделете настрана всички клубени с предполагаеми симптоми на пръстеновидно гниене и ги тествайте отделно.

Ако по време на премахването на столоните се наблюдават симптоми на пръстеновидно гниене по сърцевината на столоните, клубенът трябва да се прегледа визуално след разрез близо до столона. Всеки клубен с предполагаеми симптоми трябва да бъде суберизиран при стайна температура за два дни и съхранен под карантина (при температура от 4 до 10 °C), докато не завършат всички изпитвания. Всички клубени в пробата (включително тези с предполагаеми симптоми) трябва да се съхраняват съгласно приложение II.

3.1.2. Събирайте сърцевината на столоните в неупотребявани контейнери, които могат да се изхвърлят и които могат да бъдат затворени и/или запечатани (в случай че контейнерите се използват повторно, те трябва да бъдат щателно почистени и дезинфекцирани като се използват хлорни съединения). Препоръчително е сърцевината на столоните да се обработи незабавно. Ако това не е възможно, ги

съхранете в контейнер, без да добавяте буфер, замразени за не по-дълго от 72 часа или не по дълго от 24 часа при стайна температура. Изсушаването и суберизацията на сърцевините и развитието на сапрофити по време на съхранението могат да възпрепятстват откриването на бактерията на пръстеновидното гниене.

3.1.3. Обработете сърцевината на столоните по една от следните процедури:

а) покрийте сърцевините с достатъчно обем (приблизително 40 ml) екстракционен буфер (допълнение 3) и разклатете на ротационен шейкър (50- 100 rpm) за четири часа при под 24 °C или от 16 до 24 часа замразени,

или

б) хомогенизирайте сърцевините с достатъчен обем (приблизително 40 ml) екстракционен буфер (допълнение 3) или в блендер (например Waring или Ultra Thugax), или чрез разбиване в запечатана торбичка за мацерация за еднократна употреба (например Stomacher или Bioreba здрав полиетилен, 150 mm × 250 mm; стерилизиран с облъчване), като използвате гумено чукче или подходящ апарат за счукване (например Homex).

*Бележка:*

Рискът от кръстосана инфекция на проби е висок, когато се хомогенизират пробите с блендер. Вземете предпазни мерки, за да избегнете аерозолно поражение или разпиляване по време на процеса на екстракция. Уверете се, че се използват прясно стерилизирани остриета на блендера и съдове за всяка проба. Ако ще се използва PCR тест, избягвайте остатъците от ДНК по контейнерите или апарата за смачкване. Разбиването в торбички за еднократна употреба и използването на туби за еднократна употреба се препоръчва, където ще се използва PCR.

3.1.4. Прелейте супернатантата. Ако е твърде мътна, я избистрете с центрофугиране на ниска скорост (при не повече от 180 g за 10 min при температура между 4 и 10 °C) или чрез вакуумна филтрация (40 до 100 µm), като измивате филтъра с допълнителен (10 ml) екстракционен буфер (допълнение 3).

3.1.5. Концентрирайте бактериалната фракция чрез центрофугиране при 7000 g за 15 min (или 10000 g за 10 min) при температура между 4 и 10 °C и изхвърлете супернатантата ,без да разклащате утайката.

3.1.6. Ресуспендирайте утайката в 1,5 ml буфер за утайка (допълнение 3). Използвайте 500 µl за тестване за *C. m. subsp. sepedonicus*, 500 µl за *Ralstonia solanacearum* и 500 µl за референтни цели. Добавете стерилен глицерол до крайна концентрация от 10 до 25 % (v/v) към 500-те µl референтна аликвота и към оставащата тест аликвота, разбийте и съхранете при – 16 до – 24 °C (седмици) или – 68 до – 86 °C (месеци). Пазете тест аликвотите при 4- 10 °C по време на тестването. Не е желателно повторно замразяване и топене. Ако се налага транспортиране на екстракта, осигурете доставяне в хладилна кутия в рамките на 24- 48 часа.

3.1.7. Задължително е всички положителни контроли и проби от *C. m. subsp. sepedonicus* да се третират отделно, за да се избегне заразяване. Това се отнася за слайдовете за имунофлуоресценция и за всички тестове.

## 3.2. Картофени растения

*Бележка:*

За откриване на латентни популации от *C. m. subsp. sepedonicus* е препоръчително да се тестват смесени проби. Процедурата може да бъде подходящо приложена за смесени проби до 200 части от стъбла. (Там където се извършват наблюдения, те трябва да се основават на статистически представителна проба от растителната популация под проучване.)

3.2.1. С чист дезинфекциран нож или лозарски ножици премахнете участък от 1 до 2 cm от основата на всяко стъбло, над нивото на почвата.

Дезинфекцирайте стъблените части за кратко в етанол 70 % и незабавно ги подсушете на филтърна хартия.

Съхранявайте ги в затворен стерилен контейнер съгласно следните процедури за обработване на пробата:

3.2.2. Обработете частите по една от следните процедури:

а) покрийте частите със достатъчен обем (приблизително 40 ml) екстракционен буфер (допълнение 3) и разклатете в ротационна клатачка (50- 100 грm) за 4 часа под 24 °C или за 16- 24 часа замразени,

или

б) обработете незабавно. Като ги разбийте в здрава торбичка за мацерация (например Stomacher от Bioreba) с подходящ обем екстракционен буфер (допълнение 3) като използвате гумено чукче или подходящ апарат за счукване (например Nomex). Ако това не е възможно, съхранявайте частите от стъблата замразени за не по-дълго от 72 часа или за не по-дълго от 24 часа при стайна температура.

3.2.3. Прелейте супернатантата след утаяване от 15 минути.

3.2.4. По-нататъшно избистряне на екстраката или концентрата на бактериалната фракция обикновено не се изискват, но могат да бъдат постигнати чрез филтрация и/или центрофугиране, както е описано в раздели 3.1.4- 3.1.6.

3.2.5. Разделете чистия или концентриран екстракт от пробата на 2 равни части. Поддържайте едната половина при 4- 10 °C по време на тестването и съхранявайте другата половина с 10- 25 % (v/v) сктерилен глицерол при – 16 до – 24 °C

(седмици) или при – 68 до – 86 °C (месеци), в случай че се налага по-нататъшно тестване.

#### 4. ИМУНОФЛУОРЕСЦЕНТЕН ТЕСТ

##### **Принцип**

Използването на имунофлуоресцентен тест като основен скринингов тест се препоръчва поради доказаната му яснота да постига изискваните нива.

Когато се използва имунофлуоресцентен тест като основен скринингов тест и резултатите от имунофлуоресценцията са положителни, то PCR тест или FISH тест трябва да бъдат извършени като втори скринингов тест. Когато имунофлуоресцентен тест се използва като втори скринингов тест и резултатите от имунофлуоресценцията са положителни, за да се завършат анализите, се изисква по-нататъшно тестване съгласно диаграмата.

##### *Бележка:*

Винаги използвайте поликлонални антитела, когато се използва имунофлуоресцентен тест като основен скринингов тест. В случай на положителни резултати от имунофлуоресценцията с поликлонални антитела по-нататъшен скрининг на пробата с моноклонални антитела може да предостави повече специфичност, но може да е по-слабо чувствителен.

Използвайте антителата за референтен щам на *C. m. subsp. sepedonicus*. Препоръчително е титърът да се определя за всяка нова серия антитела. Титърът се определя като най-високото разреждане, при което настъпва оптимална реакция, когато при тестване на суспензия, съдържаща от  $10^5$  до  $10^6$  клетки/ml от хомоложен щам на *C. m. subsp. sepedonicus*, и като се използва флуоресцентен изоцианат (FITC), се свързват съгласно препоръките на производителя. Суровите поликлонални или моноклонални антитела трябва да имат титър от поне 1:2000. По време на тестването антителата трябва да бъдат използвани при работни дози (WD) близки до или равни на титъра. Използвайте валидирани антитела. (вж. интернет страницата <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Тестът трябва да се провежда на прясно приготвени екстракти от пробата. Ако е необходимо, може да бъде успешно проведен на екстракти съхранявани при – 68 до – 86 °C в глицерол. Глицеролът може да бъде премахнат от пробата чрез добавяне на 1 ml утаечен буфер (допълнение 4), повторно центрофугиране за 15 мин при 7000 g и ресуспензиране в еднакъв обем от утаечен буфер. Това често не е необходимо, особено ако пробите от слайдовете са фиксирани към слайдовете от опламеняването. (вж. 2.2).

Изгответе отделни положителни контролни слайдове от хомоложния щам или друг референтен щам на *C. m. subsp. sepedonicus*, суспендирани в картофен извлек, както е описано в допълнение 2 и по избор в буфер.

Естествено заразената тъкан (поддържана чрез лиофилизация или замразяване при  $-16$  до  $-24$  °C) трябва да бъде използвана, където е възможно, като подобна контрола на същия слайд.

Като отрицателни контроли използвайте аликвоти от извлек от пробата, които са показали отрицателни проби при тестването преди това.

Използвайте предметни стъкла с много гнезда с препоръчително 10 прозорчета от поне 6 mm в диаметър.

Тествайте контролния материал по еднакъв начин, както пробата/ите.

4.1. Пригответе слайдовете за тестване по една от следните процедури:

i) За утайки с относително малко утайка от скорбяла:

Пипетирайте един измерен стандартен обем (15  $\mu$ l е подходящ за прозорче с диаметър 6 mm, увеличете обема за по-големи прозорчета) от разтвор 1/100 от ресуспендираната картофена утайка върху първото прозорче. След това пипетирайте подобен обем от неразтворената утайка (1/1) върху останалите прозорчета на редицата. Вторият ред може да се използва за дубликат или за втора проба, така както е представено на фигура 1.

ii) За други утайки:

Пригответе десетични разтвори (1/10 и 1/100) от ресуспендираната утайка в буфер за утайки. Пипетирайте един измерен стандартен обем (15  $\mu$ l е подходящ за прозорче с диаметър 6 mm, увеличете обема за по-големи прозорчета) от ресуспендираната утайка и всеки разтвор на един ред от прозорчета. Вторият ред може да се използва за дубликат или за втора проба, така както е представено на фигура 2.

4.2. Изсушете капчиците на стайна температура или чрез затопляне при температура от 40 до 45 °C. Фиксирайте бактериалните клетки на стъклото или чрез загряване (15 минути при 60 °C), опламеняване с 95 % етанол, или съгласно специфичните инструкции на доставчиците на антителата.

Ако е необходимо, фиксираните стъкла могат след това да бъдат съхранявани в изсушена кутия за известно време, колкото е необходимо (максимум до 3 месеца), преди по-нататъшно тестване.

4.3. Имунофлуоресцентна процедура:

i) Съгласно изготвянето на препарати за тестване в 4.1, i):

Изгответе серия от двупластови разтвори на антитялото в имунофлуоресцентен буфер. Първата колба трябва да има 1/2 от титъра (T/2), останалите - 1/4 от титъра (T/4), 1/2 от титъра (T/2), титъра (T) и двойно на титъра (2T).



ii) Съгласно изготвянето на препарати за тестване 4.1, ii):

Изгответе работен разтвор (WD) на антиялото в имунофлуоресцентен буфер. Работният разтвор влияе на специфичността.

Фигура 1. Изготвяне на препарат за тестване съгласно 4.1, i) и 4.3, i)

Разтвори от ресуспендирана утайка

	1/100	1/1	1/1	1/1	1/1	<input type="checkbox"/>	Разтвори от ресуспендирана утайка
(Т = Т/2 титър)	T/2	T/4	T/2	T	2T	<input type="checkbox"/>	Двупластови разтвори от антисерум/антияло

Проба 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5
Дубликат на проба 1 или проба 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10

Фигура 2. Изготвяне на препарат да тестване съгласно 4.1, ii) и 4.3, ii)

Работен разтвор от антисерум/антияло

1/1	1/10	1/100	празно	празно	<input type="checkbox"/>	Десетичен разтвор на ресуспендирана утайка
-----	------	-------	--------	--------	--------------------------	--

Проба 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5
Дубликат на проба 1 или проба 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10

4.3.1. Подредете препаратите върху влажна хартия. Покрийте всяко тестово прозорче напълно с разтвор на антиялото. Обемът на антиялото, нанасян върху всяко прозорче, трябва да е поне обемът на прилаганият извлек.

Следната процедура трябва да бъде извършвана при отсъствие на специфични инструкции от доставчиците на антияло:

4.3.2. Инкубирайте препаратите върху влажна хартия под похлупак за 30 минути на стайна температура (18- 25 °C).

4.3.3. Изтръскайте капчиците от всеки препарат и изплакнете внимателно с имунофлуоресцентен буфер. Измийте чрез потапяне за 5 минути в имунофлуоресцентен буфер Tween (допълнение 3) и след това за 5 минути в имунофлуоресцентен буфер. Избягвайте получаване на аерозол или преминаване на капчици, които могат да причинят кръстосано заразяване. Внимателно премахнете излишната влага чрез нежно подсушаване.

4.3.4. Подредете препаратите на влажна хартия. Покрийте тестовите прозорчета с разтвор на FITC конюгат, използван, за да се определи титърът. Обемът на конюгата, нанасян върху прозорчетата, трябва да е идентичен с обема на нанасяното анти тяло.

4.3.5. Инкубирайте препаратите на влажна хартия под похлупак за 30 минути на стайна температура (18- 25 °C).

4.3.6. Изтръскайте капчиците от конюгат от препарата. Изплакнете и измийте, както преди (4.3.3).

Внимателно отстранете излишната влага.

4.3.7. Пипетирайте 5- 10 µl от 0,1M буфериран с фосфат глицерол (допълнение 3) или търговски увеличител против избледняване върху всяко прозорче и поставете покривното стъкло.

4.4. Тълкуване на имунофлуоресцентния тест:

4.4.1. Прегледайте тестовите препарати на епифлуоресцентен микроскоп с филтри подходящи за възбуждането на багрилото FITC, под водна или маслена имерсия при увеличение от 500 до 1000. Сканирайте прозорчетата напречно на двата диаметра при десните ъгли и по периметъра. За проби, показващи липса или нисък брой на клетки, наблюдавайте поне 40 микроскопски полета.

Проверете препарата с положителната контрола първо. Клетките трябва да са ярко флуоресцентни и напълно обагрени при определения титър на анти тялото или работния разтвор. Имунофлуоресцентният тест (раздел 4) трябва да бъде повторен, ако обагрянето е аномално.

4.4.2. Наблюдавайте за ярко флуоресциращи клетки с характерната морфология за *C. m. subsp. sepedonicus* в тестовите прозорчета на тестовите препарати (вж. интернет страницата <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Интензитетът на флуоресценцията трябва да бъде еквивалентен или по-добър от щам на положителната контрола при същия разтвор на анти тялото. Клетки с непълно оцветяване или със слаба флуоресценция трябва да бъдат игнорирани.

Ако се предполага някакво заразяване, тестът трябва да бъде повторен. Това може да бъде случай, при който всички препарати от една серия показват положителни клетки поради замърсяване на буфера или ако положителните клетки се откриват (извън прозорчето на препарата) по покривния слой на предметното стъкло.

4.4.3. Има няколко проблема, присъщи на специфичността на имунофлуоресцентния тест. Има вероятност съпътстващи популации от флуоресциращи клетки с атипична морфология и противоположно реагиращите сапрофитни бактерии с размер и морфология, подобни на *C. m. sepedonicus*, да се намерят в сърцевината на столоните на картофите и утайки с части от стъбла.

4.4.4. Отчитайте само флуоресциращи клетки с характерен размер и морфология при титъра или работния разтвор на антителата като в 4.3.

4.4.5. Тълкуване на резултатите от имунофлуоресценцията:

i) Ако се открият ярко флуоресциращи клетки с характерна морфология, преценете средния брой типични клетки на микроскопско поле и изчислете броя на типични клетки/ml от ресуспендираната утайка (допълнение 4).

Резултатите от имунофлуоресценцията са положителни за проби с поне  $5 \times 10^3$  типични клетки/ml от ресуспендираната утайка. Пробата се счита за потенциално заразена и се изисква по-нататъшно тестване.

ii) Резултатите от имунофлуоресценцията са отрицателни за проби с по-малко от  $5 \times 10^3$  клетки/ml от ресуспендираната утайка и пробата се счита за отрицателна. Не се изисква по-нататъшно тестване.

## 5. FISH ТЕСТ

### Принцип

Когато се използва FISH тест като първи скринингов тест и той даде положителен резултат, то трябва да се извърши имунофлуоресцентния тест като втори задължителен скринингов тест. Когато се използва FISH тест като втори скринингов тест и той даде положителен резултат, се изисква по-нататъшно тестване съгласно диаграмата за да се звърши диагностиката.

### Бележка:

Използвайте валидирани специфични олигопроби от *C. m. subsp. sepedonicus* (допълнение 7). Предварително тестване с този метод би трябвало да позволи възпроизводимо откриване на поне  $10^3$  до  $10^4$  клетки *C. m. subsp. sepedonicus* на ml, добавен към екстракт от пробата, която преди това е била отрицателна.

Следната процедура трябва с предимство да бъде изпълнявана на пряко приготвен екстракт от пробата, но може също да бъде изпълнена и на екстракт от пробата, който е бил съхраняван в глицерол при  $-16$  до  $-24$  °C или  $-68$  до  $-86$  °C.

Като отрицателни контроли използвайте аликвоти от екстракт от пробата, които преди това са дали отрицателни резултати за *C. m. subsp. sepedonicus*.

Като положителни контроли пригответе суспензии съдържащи  $10^5$  до  $10^6$  клетки/ml от *C. m. subsp. sepedonicus* (например щам NCPPB 4053 или PD 406) в 0,01M фосфатен буфер (PB) от три до пет дневна култура (за приготвяне вж. допълнение 2). Изгответе отделни препарати за положителни контроли от хомоложен щам или от някой друг референтен щам на *C. m. subsp. sepedonicus*, суспендиран в картофен екстракт, както е описано в допълнение 2.

Използването на етикетирана с FITC еубактериална олигопроба предлага контрола за хибридизационния процес, тъй като ще оцвети всички еубактери които са налични в пробата. Тествайте контролния материал по същия начин като пробата/ите.

### 5.1. Фиксиране на картофения екстракт

Следният протокол се базира на Wullings *et al.*, (1998):

5.1.1. Изгответе фиксационен разтвор (вж. допълнение 7).

5.1.2. Пипетирайте 100 µl от всеки екстракт от проба в епруветка на Епендорф и центрофугирайте 8 минути при 7000 g.

5.1.3. Отстранете супернатантата и разтворете пелетата в 500 µl от фиксационния разтвор, приготвен преди по-малко от 24 часа. Разбъркайте и инкубирайте една нощ при 4 °C.

Алтернативен фиксатор е 96 % етанол. За да го използвате, разтворете утайката от стъпка 5.1.2 в 50 µl 0,01M PB и 50 µl 96 % етанол. Разбъркайте сместа и инкубирайте при 4 °C 30- 60 минути.

5.1.4. Центрофугирайте 8 минути при 7000 g, отстранете супернатантата и ресуспендирайте утайката в 75 µl 0,01M PB (вж. допълнение 3).

5.1.5. Капнете 16 µl от фиксираната суспензия на чисто предметно стъкло за многократно тестване, както е показано на фигура 3. Нанесете 2 различни проби на препарата, неразтворени, и използвайте 10 µl, за да направите разтвор 1:100 (в 0,01M PB). Оставащият разтвор от пробата (49 µl) може да бъде съхранен при – 20 °C след прибавяне на 1 обем от 96 % етанол. В случай че FISH тестът изисква повторение, отстранете етанола чрез центрофугиране и добавете равен обем 0,01M PB (смесете чрез разбъркване).

Фигура 3. Постановка за FISH препарат

Проба 1 <input type="checkbox"/>	Празно <input type="checkbox"/>	Празно <input type="checkbox"/>	Празно <input type="checkbox"/>	Проба 2 <input type="checkbox"/>
Прозорче 1	Прозорче 2	Прозорче 3	Прозорче 4	Прозорче 5
Проба 1 <input type="checkbox"/>	Празно <input type="checkbox"/>	Празно <input type="checkbox"/>	Празно <input type="checkbox"/>	Проба 2 <input type="checkbox"/>
Прозорче 6	Прозорче 7	Прозорче 8	Прозорче 9	Прозорче 10

Покривно стъкло 1    Покривно стъкло 2

5.1.6. Изсушете на въздух препаратите (или на сушилня за препарати при 37 °C) и ги фиксирайте чрез опламеняване.

На този стадий процедурата може да бъде прекъсната и хибридизацията продължена на следващият ден. Препаратите трябва да бъдат съхранявани далеч от прах и сухи при стайна температура.

## 5.2. Прехибридизация и хибридизация

5.2.1. Пригответе лизозимен разтвор, съдържащ 10 mg лизозим (Sigma L-6876), в 10 ml буфер (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8.0). Този разтвор може да се съхранява, но трябва само замразяван и размразяван само веднъж. Покрийте всяка проба добре с приблизително 50  $\mu$ l лизозимен разтвор и инкубирайте 10 минута на стайна температура. След това топнете препаратите в деминерализирана вода само веднъж и изсушете с филтърна хартия.

Алтернативно вместо лизозим прибавете 50  $\mu$ l от 40 до 400  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> протеиназа K в буфер (20 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) във всяко кладенче и инкубирайте при 37 °C за 30 минути.

5.2.2. Дехидратирайте клетките в степенувани серии етанол от 50 %, 80 % и 96 % за една минута всяка. Изсушете на въздух препаратите в поставка за препарати.

5.2.3. Пригответе влажна инкубационна камерка чрез покриване на дъното на херметична кутия с тъкан от филтърна хартия, накисната в 1x хибмикс (допълнение 7). Предварително инкубирайте кутията в хибридизационна пещ при 55 °C за поне 10 минути.

5.2.4. Пригответе хибридизационен разтвор (допълнение 7), позволяващо 45  $\mu$ l на предметно стъкло, и предварително инкубирайте за 5 минути при 55 °C.

5.2.5. Поставете препаратите на котлон при 45 °C и сложете 10  $\mu$ l от хибридизационния разтвор във всеки от четирите кладенчета на препарата(ите).

5.2.6. Поставете 2 покривни стъкла (24 × 24 mm) на всеки препарат, без да допускате въздух. Поставете препаратите в предварително затоплена влажна камерка и хибридизирайте за една нощ в пещ при 55 °C на тъмно.

5.2.7. Пригответе три стъкленици, съдържащи 1 литър ултрачиста вода (UPW), 1 литър от 1x хибмикс (334 ml 3x хибмикс и 666 ml UPW) и 1 литър от 1/2x хибмикс (167 ml 3x хибмикс и 833 ml UPW). Предварително инкубирайте всяка на водна баня при 55 °C.

5.2.8. Махнете покривните стъкла от препаратите и поставете препаратите в кутия за препарати.

5.2.9. Отмийте излишната проба чрез инкубация за 15 минути в стъкленица с 1x хибмикс при 55 °C.

5.2.10. Преместете кутията за препарати в 1/2 хибмикс разтвор за измиване и инкубирайте за още 15 минути.

5.2.11. Потопете препаратите за кратко в УЧВ (UPW) и ги поставете върху филтърна хартия. Отстранете излишната влага чрез внимателно покриване на повърхността с филтърна хартия. Пипетирайте 5- 10 µl от разтвора на увеличителя против избледняване (например Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA или еквивалентен) върху всяко прозорче и поставете голямо покривно стъкло (24 × 60 mm) върху целия препарат.

### 5.3. Тълкуване на FISH теста

5.3.1. Наблюдавайте препаратите веднага с микроскоп, пригоден за епифлуоресцентна микроскопия при 630 до 1000x увеличение, под имерсионни масла. С филтър, подходящ за флуоресцентен изотиоцианат (FITC), еубактериалните клетки (включително повечето грамтрицателни клетки) в пробата се оцветяват във флуоресцентно зелено. Като се използва филтър за тетраметилпродамин-5-изотиоцианат, СуЗ-оцветените клетки на *C. m. subsp. sepedonicus* се наблюдават като флуоресцентно червени. Сравнете морфологията на клетките с тази на положителните контроли. Клетките трябва да са ярко флуоресциращи и напълно оцветени. FISH тестът (раздел 9.4) трябва да бъде повторен, ако оцветяването е аномално. Сканирайте прозорчетата напречно през двата диаметра при десните ъгли и по периметъра. За проби без или с нисък брой клетки наблюдавайте поне 40 микроскопски полета.

5.3.2. Наблюдавайте за ярко флуоресциращи клетки с характерна морфология за *C. m. subsp. sepedonicus* в тестовото прозорче на тестовите препарати (вж. интернет страницата <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Интензивността на флуоресценцията трябва да бъде еквивалентна или по-добра от тази на щама на положителната контрола. Клетки с непълно оцветяване или слаба флуоресценция не трябва да бъдат отчитани.

5.3.3. Ако се предполага някакво заразяване, тестът трябва да бъде повторен. Това може да бъде случай, при който всички препарати от една серия показват положителни клетки поради замърсяване на буфера или ако се намират положителни клетки (извън прозорчетата на препаратата) по покривния слой на предметното стъкло.

5.3.4. Има няколко проблема, присъщи на специфичността на FISH теста. Има вероятност съпътстващи популации от флуоресциращи клетки с атипична морфология и противоположно реагиращите сапрофитни бактерии с размер и морфология, подобни на *C. m. subsp. sepedonicus*, да се намерят в сърцевината на столоните на картофите и утайките с части от стъбла макар и по-рядко, отколкото при имунофлуоресцентния тест.

5.3.5. Отчитайте само флуоресциращи клетки с типичен размер и морфология, вж. 5.3.2.

5.3.6. Тълкуване на резултатите от FISH теста:

i) Валидни резултати от FISH теста се получават, ако се наблюдават яркозелени флуоресциращи клетки с размер и морфология, типични за *C. m. subsp. sepedonicus*, като се използва FITC филтър, и ярко оцветени флуоресциращи клетки, като се използва родаминов филтър във всички положителни контроли и в нито една от отрицателните контроли. Ако се открият ярко флуоресциращи клетки с типична морфология, пресметнете средния брой типични клетки на микроскопско поле и изчислете броя на типични клетки на мл от ресуспендирана утайка (допълнение 4). Проби с поне  $5 \times 10^3$  типични клетки/ml от ресуспендирана утайка се считат за потенциално заразени. Изисква се по-нататъшно тестване. Пробите с по-малко от  $5 \times 10^3$  типични клетки/ml от ресуспендирана утайка се считат за отрицателни.

ii) FISH тестът е отрицателен, ако не се наблюдават ярко оцветени флуоресциращи клетки с размер и морфология, типични за *C. m. subsp. sepedonicus*, като се използва родаминов филтър, при условие че типични ярко оцветени флуоресциращи клетки се наблюдават във всички препарати с положителни контроли, като се използва родаминов филтър

## 6. PCR ТЕСТ

### Принципи

Когато се използва PCR тест като основен скринингов тест и той даде положителни резултати, трябва да се извърши имунофлуоресцентен тест като втори задължителен скринингов тест. Когато се използва PCR тест като втори скринингов тест и той даде положителни резултати, се изисква по-нататъшно тестване според диаграмата за да се завърши диагностиката.

Пълно използване на този метод като основен скринингов тест се препоръчва само когато е била получена специална експертиза.

### Бележка:

Предварително тестване с този метод би трябвало да позволи възпроизводимо откриване на  $10^3$  до  $10^4$  клетки от *C. m. subsp. sepedonicus* на ml, прибавени към екстрактите от пробата, които преди това са дали отрицателни резултати. Може да се наложат опити за оптимизиране, за да се постигнат максималните нива на чувствителност и специфичност във всички лаборатории.

Използвайте валидирани реактиви и протоколи за PCR. Препоръчително е да изберете метод с вътрешен контрол.

Използвайте подходящи предпазни мерки за да избегнете замърсяване на пробата с целева ДНК. PCR тестът трябва да се извършва от опитни лаборанти в специализирани лаборатории по молекулярна биология с оглед да се минимизира възможността от заразяване с целева ДНК.

Отрицателните контроли (за ДНК екстракция и PCR процедури) трябва винаги да бъдат третирани като крайни проби в процедурата, за да стане ясно дали е станало някакво пренасяне на ДНК.

В PCR теста трябва да бъдат включени следните отрицателни контроли:

- екстракт от пробата, която преди това е показала отрицателни резултати за *C. m. subsp. sepedonicus*,
- буферни контроли използвани за екстракция на бактерията и ДНК от пробата,
- реакционна смес за PCR.

Трябва да бъдат включени следните положителни контроли:

- аликвоти от ресуспендирани утайки, към които е бил прибавен *C. m. subsp. sepedonicus* (за подготовка вж. допълнение 2),
- суспензия от *C. m. subsp. sepedonicus* на  $10^6$  клетки/ml във вода от вирулентен изолат (например NCPPB 2140 или NCPPB 4053),
- ако е възможно, използвайте също ДНК, извлечена от проби на положителни контроли при PCR тест.

*За да избегнете потенциално заразяване пригответе положителни контроли в отделна среда от пробите, които ще се тестват.*

Екстрактите от проби трябва да бъдат колкото е възможно по-чисти от почва. Следователно в определени случаи може да е препоръчително да се приготвят извлекци от измити картофи, ако трябва да се използват протоколите от PCR.

### **6.1. Методи за пречистване на ДНК**

Използвайте положителни и отрицателни контролни проби, както е описано по-горе.

Използвайте контролния материал по същия начин както за пробата/ите.

На разположение има разнообразие от методи за пречистване на целева ДНК от сложните субстрати на пробата, като по този начин се премахват инхибиторите на PCR и други ензимни реакции и концентриращи целевата ДНК в екстракта от пробата.

Следните методи са били оптимизирани за използване с валидирания PCR метод, показан в допълнение 6.

#### **6.1. а) Метод на Пастрик (2000)**



1. Пипетирайте 220  $\mu$ l лизисен буфер (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) в 1,5 ml епендорфова епруветка.
2. Добавете 100  $\mu$ l екстракт от пробата и поставете в термостат или на водна баня при 95  $^{\circ}$ C за 10 минути.
3. Сложете епруветката върху лед за пет минути.
4. Добавете 80  $\mu$ l разтвор на лизозим за съхраняване (50 mg лизозим на ml в 10 mM Tris HCl, pH 8,0) и инкубирайте при 37  $^{\circ}$ C за 30 минути.
5. Добавете 220  $\mu$ l Easy DNA<sup>®</sup> разтвор А (Invitrogen), разбъркайте добре чрез разбъркване и инкубирайте при 65  $^{\circ}$ C 30 минути.
6. Добавете 100  $\mu$ l Easy DNA<sup>®</sup> разтвор В (Invitrogen), разбъркайте енергично, докато преципитатът потече свободно в епруветката и пробата стане еднообразно вискозна.
7. Добавете 500  $\mu$ l хлороформ и разбъркайте, докато вискозитетът намалее и сместта стане хомогенна.
8. Центрофугирайте при 15 000 g 20 минути при 4  $^{\circ}$ C, за да отделите фазите и да образувате интерфазите.
9. Прехвърлете горната фаза в нова епендорфова епруветка.
10. Добавете 1 ml 100 % етанол ( $-20$   $^{\circ}$ C), разбъркайте за кратко и инкубирайте върху лед 10 минути.
11. Центрофугирайте при 15 000 g 20 минути при 4  $^{\circ}$ C и махнете етанола от пелетата.
12. Добавете 500  $\mu$ l 80 % етанол ( $-20$   $^{\circ}$ C) и разбъркайте чрез обръщане на епруветката.
13. Центрофугирайте при 15 000 g за 10 минути при 4  $^{\circ}$ C, запазете пелетата и отстранете етанола.
14. Оставете пелетата да изсъхне на въздух или в скоростна камера за ДНК.
15. Ресуспендирайте утайката в 100  $\mu$ l стерилна УЧВ (UPW) и оставете на стайна температура поне 20 минути.
16. Съхранете при  $-20$   $^{\circ}$ C до необходимото за PCR.
17. Утайте всички бели преципитати чрез центрофугиране и използване на 5  $\mu$ l от супернатантата, съдържаща ДНК за PCR.

6.1. б) Други методи

Други методи за екстракция на ДНК (например Qiagen DNeasy Plant Kit) могат да бъдат прилагани, при условие че за тях е доказано, че са толкова ефективни в пречистването на ДНК от контролни проби, съдържащи  $10^3$  до  $10^4$  патогенни клетки/ml.

## 6.2. PCR

6.2.1. Пригответе тестови и контролни модели за PCR според валидираните протоколи (допълнение 6). Пригответе едно десетично разреждане на ДНК екстракт от пробата. (1:10 в УЧВ (UPW)).

6.2.2. Пригответе подходящата реакционна смес за PCR в среда, свободна от зараза според публикувания протокол (допълнение 6). Валидираният PCR протокол е многостранна реакция, която също включва вътрешен PCR контрол.

6.2.3. Добавете 5  $\mu$ l ДНК екстракт на 25  $\mu$ l PCR реакция в стерилни PCR епруветки.

6.2.4. Включете отрицателна контролна проба, съдържаща само реакционна смес за PCR, и добавете същия източник на УЧВ (UPW), така както е използван в сместа за PCR на място на пробата.

6.2.5. Поставете епруветките в същия термоцикълор, който е бил използван при предварителното тестване и включете оптимизирана PCR програма (допълнение 6).

## 6.3. Анализ на продукта от PCR

6.3.1. Разтворете наново PCR ампликоните чрез електрофореза с агарозен гел. Излейте поне 12  $\mu$ l амплифицирана ДНК реакционна смес от всяка проба с 3  $\mu$ l пълнеж буфер (допълнение 6) в 2,0 % (w/v) агарозни гелове в три-ацетат-EDTA (ТАЕ) буфер (допълнение 6) при 5- 8 V/cm. Използвайте подходящ ДНК маркер, например 100 bp стълбица.

6.3.2. Разкрийте ДНК поясите чрез обагряне в етидиум бромид (0,5 mg/l) за 30- 45 min, като вземете подходящи *предпазни мерки за боравене с този мутаген*.

6.3.3. Наблюдавайте обагрения гел при къса UV транслюминация (например  $\lambda = 302$  nm) за амплифицирани PCR продукти от очаквания размер (допълнение 6) и документирайте.

6.3.4. За всички нови заключения/случаи проверявайте автентичността на PCR ампликона чрез извършване на рестрикционен ензимен анализ на проба от оставащата амплифицирана ДНК чрез инкубиране при оптимална температура и време с подходящ ензим и буфер (вж. допълнение 6). Разтворете наново разтворените фрагменти чрез електрофореза с агарозен гел, както преди, и наблюдавайте характерния фрагмент на ограничаване под UV транслюминация след обагряне с етидиум бромид и сравнете с разтворените и неразтворени положителни контроли.

Тълкуване на резултата от PCR теста:

PCR тестът е отрицателен, ако специфичният за *C. m. subsp. sepedonicus* PCR ампликон с очаквания размер не се намира в съответната проба, но се намира във всички положителни контролни проби (в случай на многостранна PCR със специфични за растението вътрешни контролни праймери: втори PCR продукт от очаквания размер трябва да бъде намножен със съответната проба).

PCR тестът е положителен, ако специфичният за *C. m. subsp. sepedonicus* PCR ампликон с очаквания размер и ограничителен модел се открива, при условие че не се увеличава от никоя от отрицателните контролни проби. Достоверно потвърждение на положителен резултат може също да се получи чрез повтаряне на теста с втора серия от PCR праймери (раздел 9.3).

Бележка:

Може да се предполага инхибиране на PCR, ако очакваното намножаване е получено от проба с положителна контрола, съдържаща *C. m. subsp. sepedonicus* във вода, но отрицателните резултати са били получени от положителни контроли с *C. m. subsp. sepedonicus* в картофен извлек. В многостранни PCR протоколи с външни PCR контроли има индикации за инхибирането, когато не е получен нито един от двата ампликона.

Може да се предполага заразяване, ако очакваният ампликон се получава от една или повече отрицателни контроли.

## 7. БИОЛОГИЧЕН ТЕСТ

Бележка:

Предварителното тестване с този тест трябва да позволи възпроизводимо откриване  $10^3$  до  $10^4$  единици от *C. m. subsp. sepedonicus*, формиращи колония на ml, прибавен към екстракта от пробата, която преди това е дала отрицателен резултат. (за приготвянето вж. допълнение 2).

Най-голяма чувствителност на откриването може да се очаква, когато се използват прясно приготвен екстракт и оптимални условия на растеж. Въпреки това методът може успешно да се приложи и за екстракти, които са били съхраняване в глицерол при  $-68$  до  $-86$  °C.

Някои сортове патладжан предлагат отлична селективна обогатена среда за растежа на *C. m. subsp. sepedonicus* дори при отсъствие на симптоми и също предоставят отличен тест за потвърждаване на гостоприемника.

Условията на растеж трябва да са оптимални за да се намали риска от фалшиви отрицателни резултати от теста.

За подробности за културата вж. допълнение 8.

7.1. Разпределете цялата оставаща тест аликвота от ресуспендираната утайка от раздел 3.1.6 или 3.2.5 между патладжани по един от методите, дадени по-долу (7.3 или 7.4). Използвайте само растения на листен стадий две до три до пълно разгъване на третият същински лист. За да се гарантира пълно оползотворяване на ресуспендираната утайка, както и ефективна инокулация, подчертаните по-долу процедури ще изискват 15- 25 растения от патладжан на проба.

7.2. Не поливайте патладжаните един или два дни преди инокулацията, за да намалите тургорното налягане.

### 7.3. Инокулация чрез срязване

7.3.1. Като придържате растението между два пръста, пипетирайте една капка (приблизително 5- 10  $\mu$ l) от суспендираната утайка върху стъблото между котиледоните (семенелни листа) и първия лист.

7.3.2. Като използвате стерилен скалпел, направете диагонален разрез, дълъг около 1,0 cm и дълбок приблизително до 2/3 от дебелината на стъблото, като започвате разреза от капката утайка от концентрирания екстракт.

7.3.3. Запечататйте разреза със стерилен вазелин от спринцовка.

### 7.4. Инокулация със спринцовка

Инжектира се стъблото на патладжана точно над котиледоните, като използвате спринцовка с игла за подкожно инжекция (не по-малка от 23 G). Разпределете пробата между патладжаните.

7.5. Като положителни контроли инокулирайте 5 растения с водна суспензия на  $10^5$  до  $10^6$  клетки/ml позната култура на *S. m. subsp. sepedonicus* и, където е възможно, с естествено заразна тъкан от клубени (вж. раздел 4) по същия инокулационен метод (7.3 или 7.4).

7.6. Като отрицателни контроли инокулирайте 5 растения със стерилен буфер от утайката по същият инокулационен метод (7.3 или 7.4).

7.7. Инкубирайте растенията в карантинни съоръжения до четири седмици при 18-24 °C. Инкубирайте растенията при достатъчно светлина и висока влажност (70-80 %) и вода, за да предотвратите напукване или спаружване поради недостиг на вода. Клетките на *S. m. sepedonicus* загиват при температура 30 °C и оптималната температура е 21 °C. За да избегнете заразяване, инкубирайте растенията от положителната и отрицателната контрола на ясно разделени маси в оранжерия или парник за развъждане или, в случай че мястото е ограничено, оскигурете строго разделяне между третиранията. Ако растенията за различни проби трябва да бъдат инкубирани близо едно до друго, отделете ги с подходящи прегради. Когато наторявате, поливайте, инспектирайте или извършвате някакви други манипулации, внимавайте изключително много, за да избегнете кръстосано заразяване. Важно е

да се пазят оранжерии и парниците за развъждане свободни от всички насекомни вредители, тъй като те могат да пренесат бактерията от проба на проба.

7.8. Преглеждайте редовно за симптоми, като започвате след една седмица. Препоръчвайте растенията, показващи симптоми. *C. m. subsp. sepedonicus* причинява повяхване на листата при патладжаните, което може да започне като омекване на тъканите по периферията на листата или между нерватурата. Засегнатата тъкан може първоначално да бъде тъмнозелена или на петна, но в последствие избледнява преди да некротизира. При увяхване между жилките повърхността често изглежда мазна и много водна. Мъртвата тъкан е често яркочълта по края. Растенията не умират непременно. Колкото по-дълъг е периодът, преди да се развият симптомите, толкова по-голям е шансът за оцеляване. Растенията могат да превъзмогнат инфекцията. Младите патладжани са много по-чувствителни към ниски популации на *C. m. subsp. sepedonicus*, отколкото по-старите растения, и оттам следва необходимостта да се използват растения в третата фаза на разлистване или точно преди нея.

Увяхането може също да се предизвика и от популации на други бактерии или гъби, намиращи се в концентрирания екстракт от картофените клубени. В тях са включени *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* и *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *Erwinia chrysanthemi*, *Phoma exigua* var. *foveata*, както и големи популации на сапрофитни бактерии. В частност *Erwinia chrysanthemi* може да предизвика симптоми по листата и увяхване, които са много сходни с тези на *C. m. subsp. sepedonicus*. Единствената разлика е почерняването на стъблата в случай на инфекции с *Erwinia chrysanthemi*. Другото повяхване може да бъде разграничено от повяхването, причинено от *C. m. subsp. sepedonicus*, тъй като при него цели листа или цели растения бързо увяхват. Също може да се приготви и Грам оцветяване: така тестът ще различи *C. m. subsp. sepedonicus* от *Erwinia* spp.

7.9. Веднага щом се наблюдават симптомите при патладжаните, трябва да се направи реизолиране, като се използват участъци от тъкан на повехнали листа или тъкан от стъбла на растения (вж. 3.1.3 за тъканна мацерация). Дезинфектира се повърхността на листата и стъблата на патладжаните със 70 % етанол. Направете имунофлуоресцентен тест или PCR тест на патладжанен сок и изолирайте на подходяща (серлективна) среда (вж. раздел 8). Може също да се приготви и Грам оцветяване (допълнение 9). Идентифицирайте пречистени култури от предполагаем *C. m. subsp. sepedonicus* и потвърдете патогенността (вж. раздели 9 и 10).

7.10. При определени обстоятелства, особено където условията на растеж не са оптимални, е възможно *C. m. subsp. sepedonicus* да присъства като латентна инфекция в патладжаните дори след инкубационен период до 4 седмици. Ако не се наблюдават симптоми след 4 седмици, извършете IF/PCR тест на смесена проба от 1 cm части от стъбла от всяко тестово растение, взети от участъка над инокулацията. Ако тестът е положителен, трябва да се извърши наново изолация върху подходяща (селективна) среда, като се следва процедурата от раздел 8. Идентифицирайте пречистени култури от предполагаем *C. m. subsp. sepedonicus* и потвърдете патогенността (вж. раздели 9 и 10).

Тълкуване на резултатите от биологичния тест.

Валидни резултати от биологичния тест се получават, когато растенията от положителните контроли показват типични симптоми, бактериите могат да бъдат повторно изолирани от тези растения и не са открити симптоми по отрицателните контроли.

Биологичният тест е отрицателен, ако тестовите растения не са заразени с *C. m. subsp. sepedonicus* и при условие че *C. m. subsp. sepedonicus* не се открива в положителните контроли.

Биологичният тест е положителен, ако тестовите растения са заразени с *C. m. subsp. sepedonicus*.

## 8. ИЗОЛИРАНЕ НА *C. M. SUBSP. SEPEDONICUS*

Бележка:

Диагностицирането може да се потвърди, само ако *C. m. subsp. sepedonicus* бъде изолиран и впоследствие идентифициран (вж. раздел 9). Въпреки че *C. m. subsp. sepedonicus* е труден за изолиране вредител, той може да се изолира от тъкани с характерни симптоми.

Въпреки това той може да бъде изпреварен от други бързорастящи сапрофитни бактерии и поради това директното му изолиране от клубена или утайка от стъблена тъкан (мацерат) (раздел 3.1.6 или 3.2.5.) е трудно. Със селективна среда и подходящо разреждане на ресуспендираната утайка (мацерат) от конусите или от стъблата на картофите директното изолиране на *C. m. subsp. sepedonicus* може да е възможно.

Изолирането трябва да се прави от всички картофени клубени или части от стъбла със симптоми и от растенията на патладжана, при които не се наблюдават симптоми, IF/PCR теста от смесената проба е бил положителен (вж. раздел 7.10). Където е необходимо мацерацията на стъблата на патладжаните може да бъде извършена, както е описано в раздел 3.1.3.

Като положителни контроли пригответе десетични разреждания от суспензия от  $10^6$  cfu/ml от *C. m. subsp. sepedonicus* (например NCPPB 4053 или PD 406). За да избегнете каквато и да е вероятност от заразяване, пригответе положителни контроли напълно отделно от пробите, които ще се тестват.

За всяка новоприготвена серия от селективна среда трябва да се тества нейната пригодност за растеж на патогена, преди тя да се използва за тестване на рутинни проби. Тествайте контролния материал по идентичен начин като пробата/ите.

### 8.1. Селективна посевка

8.1.1. От 100 µl аликвота от проба от ресуспендираната картофена утайка (мацерат) или сок от патладжан направете 10-кратни разреждания в буфер за утайка (допълнение 3).

8.1.2. Изолирането от неразредена картофен екстракт обикновено се проваля поради трудният растеж на *Cms* и конкуренция от сапрофитите. Тъй като бактерията обикновено присъства в големи популации в заразените тъкани, сапрофитите обикновено могат да бъдат отмити, докато патогенът остава. Поради това се препоръчва да се разпредели 100 µl от всяка от пробите, от 1/100 до 1/10 000 разреждания върху MTNA среда или NCP-88 среда (допълнение 5) (ако се използват петриевы блюда с диаметър 90 mm пригответе обема за алтернативен размер на блюдата), като се използва инструмент за мазане (като стикове за хокей) и техниката за намазване на плоча.

*Бележка:*

Алтернативно стратегия е да се размаже първоначалната аликвота от 100 µl картофен извлек върху първата агарна плоча с инструмент за мазане и след това да се премахне инструмента към втората агарна плоча, като се размазва целият остатък, останал на инструмента, най-накрая повторете това с третата плоча, като по този начин произвеждате ефект на разреждане на плочите чрез инструмента за мазане.

8.1.3. Инкубирайте плочите на тъмно при 21- 23 °C.

8.1.4. Първоначални прегледи на плочите, включително по референция на контролните плочи, преброявания на някакви подобни на колонии на *C. m. subsp. sepedonicus* се правят след 3 дни с последващи преброявания след 5, 7 и накрая 10 дни.

## 8.2. Пречистване на предполагаеми колонии

*Бележка:*

Подкултивирането на подобни на *C. m. subsp. sepedonicus* колонии трябва да бъде извършвано върху YGM среда за инокулация на патладжан и/или последваща идентификация; това трябва да бъде извършвано преди платата да се разраснат твърде много т.е. за предпочитане след три до пет дни.

8.2.1. Прави се натривка отподобни на *C. m. subsp. sepedonicus* колонии върху една от следните хранителни среди: (формулите са дадени в допълнение 5):

хранителен декстрозен агар (за употреба само при субкултура),

дрожден пептонен глюкозен агар,

дрожден екстракт с минерални соли.

Инкубирайте при 21- 24 °С до 10 дни.

*C. m. subsp. sepedonicus* расте бавно, обикновено дава точковидни кремави куполообразни колонии за 10 дни. За снимки на типични колонии на *C. m. subsp. sepedonicus* вж. интернет страницата <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

8.2.2. Натрийте отново за да установите чистота.

Темповете на растеж се подобряват в субкултурата. Типичните колонии са кремавобели или с цвят на слонова кост, рядко жълти, заоблени, гладки, издигнати, с изпъкнал купол, мукоидно-течни, с ясни краища и диаметър обикновено от 1 до 3 mm.

Прост щам (допълнение 9) може да помогне да се подберат колонии за по-нататъшно тестване.

8.2.3. Идентифицирайте предполагаемите култури (вж. раздел 9) и направете тест за патогенност (вж. раздел 10).

## 9. ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Определяйте чисти култури от предполагаеми изолати на *C. m. subsp. sepedonicus*, като използвате един от следните тестове, базирани на различни биологични принципи.

Включете познати референтни щамове, където е уместно за всеки провеждан тест.

### 9.1. Хранителни и ензимни тестове за идентификация

Определете следните фенотипни възможности, които са универсално застъпени или отсъстващи при *C. m. subsp. sepedonicus*, съгласно методите на Лелио и Стед (Lelliott and Stead) (1987), Клемен и кол. (Klement et al.) (1990), Шаад (Schaad) (2001), Анонимен (Anonymous) (1987).

Всички среди трябва да бъдат инкубирани при 21 °С и прегледани след шест дни. Ако не е настъпил растеж, инкубирайте 20 дни.

Всички тестове трябва да включват позната контрола на *C. m. subsp. sepedonicus*. Хранителните и физиологичне тестове трябва да се правят, като се използва инокулат от субкултури от хранителен агар. Морфологичните сравнения трябва да се правят от култури от хранителен декстрозен агар.

*Тестове*      *Очакван резултат*

Окислително-ферментационен тест (O/F) инертен или слабо окислителен

Окислителна активност      –



- Растеж при 37 °C –
- Уреазна активност –
- Хидролиза на ескулина +
- Хидролиза на скорбялата – или слаба
- Толеранс от 7 % разтвор на NaCl –
- Произвеждане на индол –
- Каталазна активност +
- Произвеждане на H<sub>2</sub>S –
- Използване на цитрат –
- Втечняване на желатин –
- Кисела реакция от глицерин –
- Кисела реакция от лактоза – или слаба
- Кисела реакция от рамноза –
- Кисела реакция от салицин –
- Грам оцветяване (допълнение 9) +

## 9.2. Имунофлуоресцентен тест

- а) Пригответе суспензия от приблизително 10<sup>6</sup> клетки/ml в имунофлуоресцентен буфер (допълнение 3).
- б) Пригответе серия от двукратни разреждания на подходящ антисерум.
- в) Приложете процедурата за имунофлуоресценция (раздел 4).
- г) Положителен имунофлуоресцентен тест се постига, ако имунофлуоресцентният титър на културата е еквивалентен на този от положителната контрола.

## 9.3. PCR тест

- а) Пригответе суспензия от приблизително 10<sup>6</sup> клетки/ml в ултрачиста вода (UPW).
- б) Загрейте 100 µl от клетъчната суспензия в затворени епруветки в термостат или на водна баня при 100 °C за 4 минути. Ако е необходимо, добавянето на прясно приготвена NaOH към крайната концентрация от 0,05M може да спомогне за

разграждането на клетките. След това пробите могат да бъдат съхранявани при – 16 до – 24 °С, докато е необходимо.

в) Приложете подходящи PCR процедури, за да увеличите специфичните ампликони от *C. m. subsp. sepedonicus* (например Pastrik, 2000; вж. допълнение 4; Li and de Boer, 1995; Mills *et al.*, 1997; Pastrik and Rainey, 1999; Schaad *et al.*, 1999).

г) Положителна идентификация на *C. m. subsp. sepedonicus* се постига, ако PCR ампликоните са същият размер и имат същият полиморфизъм по отношение ограничение участък от дължината катко щамът от положителната контрола.

#### 9.4. FISH тест

а) Пригответе суспензия от приблизително  $10^6$  клетки/ml в UPW.

б) Приложете FISH процедурата (раздел 5).

в) Положителен FISH тест се постига, ако се получат едни и същи реакции от културата и от положителната контрола.

#### 9.5. Профилиране на мастните киселини (FAP)

а) Отгледайте културата на трипитказен соев агар (Oxoid) 72 часа при 21 °С (+/- 1°).

б) Приложете подходяща FAP процедура (Janse, 1991; Stead, 1992).

в) Положителен FAP тест се получава, когато профилът на предполагаемата контрола е идентичен с този на положителната контрола. Наличието на характерните мастни киселини 15:1 Anteiso A, 15:0 Iso, 15:0 Anteiso, 16:0 Iso, 16:0 и 17:0 Anteiso е много индикативно за *C. m. sepedonicus*. Други родове като *Curtobacterium*, *Arthrobacter* и *Micrococcus* също имат такива киселини, но някои от тези киселини, но 15:1 Anteiso A е рядка киселина в тези бактерии, но се среща във всички видове *Clavibacter* spp. между 1 и 5 %. При *C. m. sepedonicus* стойността обикновено е около 5 %.

#### 9.6. BOX-PCR

а) Пригответе суспензия от приблизително  $10^6$  клетки/ml в UPW.

б) Приложете теста съгласно процедурата. (Smith *et al.*, 2001).

### 10. ТЕСТ ЗА ПОТВЪРЖДАВАНЕ

Тестът за патогенност трябва да се извърши като крайно потвърждаване на диагностиката на *C. m. subsp. sepedonicus* и за оценка на вирулентността на културите идентифицирани *C. m. subsp. sepedonicus*:

10.1. Пригответе инокулум от приблизително  $10^6$  клетки/ml от култури на 3 дни от изолати, които да бъдат тествани и подходящи щамове от положителни контроли на *C. m. subsp. sepedonicus*.

10.2. Инокулирайте 5- 10 стъбла от патладжан от млади прорастъци на листен стадий 3 (раздел 7.3 или 7.4).

10.3. Инкубирайте при 18- 24 °C с достатъчно светлина и висока относителна влажност, за да избегнете напукване или стрес от засушаване (раздел 7.7). С чисти култури типичното повяхване ще се получи за две седмици, но растенията, които не показват симптоми (вж. раздел 7.8) след този период трябва да бъдат инкубирани до три седмици при температури, които водят до растеж на патладжанените растения, но ненадхвърлящи 25 °C (допълнение 8). Ако няма симптоми след 3 седмици, културата не може да бъде потвърдена като патогенна форма на *C. m. subsp. sepedonicus*.

10.4. Изолирайте участък от стъблото 2 cm над точката на инокулация на растение със симптоми. Стрийте и суспендирайте в малък обем от стерилна дестилирана вода или 50 mM фосфатен буфер (допълнение 3). Изолирайте от утайката чрез намазване на разтвор или натриване върху MTNA и YPGA (допълнение 5), инкубирайте три до пет дни при 21- 23 °C и наблюдавайте образуването на типични за *C. m. subsp. sepedonicus* колонии.

#### Допълнение 1

#### Лаборатории, включени в оптимизирането и валидиране на протоколи

Лаборатория ( <sup>1</sup> )	Място	Държава
***[Please insert this column from the original]***	***[Please insert this column from the original]***	Австрия
		Белгия
		Дания
		Англия
		Шотландия
		Франция
		Франция
		Германия
		Германия
		Ирландия
		Нидерландия
		Норвегия
		Португалия
		Словения

(<sup>1</sup>) Учени за контакт: вж. интернет страницата  
<http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

### Допълнение 2

#### **Изготвяне на положителни и отрицателни контроли за скрининг тестове PCR/IF и FISH на сърцевината**

Изгответе 72 часова култура от вирулентен щам на *C. m. subsp. sepedonicus* (NCPBV 4053 или PD 406) върху MTNA базална среда и суспендирайте 10 mM фосфатен буфер, за да получите клетъчна плътност от приблизително 1 до  $2 \times 10^8$  cfu/ml. Това обикновено се постига чрез слабо мътна суспензия, еквивалентна на оптична плътност от 0,20 при 600 nm.

Отстранете конусчетата от 200 клубена, взети от сорт с бяла кора, за които се знае, че са свободни от *C. m. subsp. sepedonicus*.

Обработете връхчетата както обикновено и ресуспендирайте утайката в 10 ml.

Пригответе 10 стерилни 1,5-милилитрови микропруветки с 900 µl ресуспендирана утайка.

Прехвърлете 100 ml от суспензията от *C. m. subsp. sepedonicus* в първата микропруветка. Разбъркайте.

Установете десетични нива на заразяване чрез по-нататъшно разреждане в следващите 5 микрофиали.

Шестте заразени микрофиали ще бъдат използвани като положителни контроли. Четирите незаразени микрофиали ще бъдат използвани като отрицателни контроли. Надпишете микрофиалите.

Пригответе аликвоти от 100 µl в стерилни микрофиали от 1,5 ml, като по този начин получите девет повторения на всяка контролна проба. Съхранявайте при – 16 до – 24 °C до употребата.

Присъствието и количественото определяне на *C. m. subsp. sepedonicus* в контролните проби трябва първо да се потвърди от имунофлуоресценцията.

За PCR теста извършете ДНК екстракция от положителни и отрицателни контролни проби с всяка серия от тестови проби.

За имунофлуоресценцията и FISH теста извършете опити върху положителни и отрицателни контролни проби с всяка серия от тестови проби.

За имунофлуоресценцията, FISH и PCR опитите *C. m. subsp. sepedonicus* трябва да бъде открит в поне  $10^6$  и  $10^4$  клетки/ml от положителните контроли и в нито една от отрицателните контроли.

### Допълнение 3

#### Буфери за тестовите процедури

ОБЩО: Неотворените стерилизирани буфери могат да бъдат съхранявани до една година.

#### 1. Буфери за екстракционна процедура

##### 1.1. Екстракционен буфер (50 mM фосфатен буфер, pH 7,0)

Този буфер се използва за екстракция на бактерията от растителни тъкани чрез хомогенизиране или разклащане.

$\text{Na}^2\text{HPO}^4$  (anhydrous) 4,26 g

$\text{KH}^2\text{PO}^4$  2,72 g

Дестилирана вода 1.00 L

Разтворете съставките, проверете pH и стерилизирайте в автоклав при 121 °C за 15 минути.

Допълнителни компоненти могат да бъдат полезни, както следва:

	Цел	Количество (за L)
Lubrol flakes	Deflocculant (*)	0,5 g
DC silicone antifoam	Anti-foam agent (*)	1,0 ml
Tetrasodium pyrophosphate	Anti-oxidant	1,0 g
Polyvinylpyrrolidone-40 000 (PVP-40)	Спойка за инхибитори за PCR	50 g

(\*) За употреба при хомогенизацията метод за екстракция.

##### 1.2. Буфер за утайката (10 mM фосфатен буфер, pH 7,2)

Този буфер се използва за ресуспендиране и разреждане на екстракт от конусчета на картофени клубени следващи концентрирането до утайка чрез центрофугиране.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2,7 g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,4 g

Дестилирана вода 1,00 L

Разтворете съставките, проверете рН и стерилизирайте в автоклав при 121 °С за 15 минути.

## 2. Буфери за имунофлуоресцентен тест

### 2.1. IF-буфер (10 mM фосфатен буфер солен (физиологичен р-р) (PBS), рН 7,2)

Този буфер се използва за разреждане на антитела.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2,7 g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,4 g

NaCl 8,0 g

Дестилирана вода 1.0 L

Разтворете съставките, проверете рН и стерилизирайте в автоклав при 121 °С за 15 минути.

### 2.2. Буфер за имунофлуоресценция Tween

Този буфер се използва за измиване на предметните стъкла.

Прибавете 0,1 % Tween 20 към буфера за имунофлуоресценция.

### 2.3. Глицерол буфериран с фосфат, рН 7,6

Този буфер се използва като течен увеличител върху гнездата на предметните стъкла за имунофлуоресценция за да се ускорява флуоресценцията.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  3,2 g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,15 g

Глицерол 50 ml

Дестилирана вода 100 ml

Разтвори на увеличител против избледняване са търговски достъпни, напр. Vectashield® (Vector Laboratories) or Citifluor® (Leica).

## Допълнение 4

### Определяне на нивото на зараза в имунофлуоресцентни и FISH тестове

1. Избройте средния брой типични флуоресцентни клетки на зрително поле (с)

2. Изчислете броя на типични флуоресцентни клетки на гнездо от микроскопски препарат (C)

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

където S = повърхностната площ на гнездо от многогнездно предметно стъкло и

s = повърхностната площ на полето на обектива.

$s = \pi i^2 / 4G^2K^2$  където i = коефициента на полето (варира от 8 до 24 в зависимост от типа окуляр)

K = коефициента на епруветката (1 или 1,25)

G = увеличението на обектива (100x, 40x etc.).

3. Изчислете броя броя на типични флуоресцентни клетки на мл ресуспендирана утайка. (N)

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

където y = обема на ресуспендирана утайка върху всяко гнездо, и

F = фактора на разреждане на ресуспендирана утайка

#### *Допълнение 5*

#### **Среда за изолиране и култура на *C. m. subsp. sepedonicus***

*a) Обща среда за растеж*

Хранителен агар (NA)

Хранителен агар (Difco) 23,0 g

Дестилирана вода 1,0 L

Разтворете съставките и стерилизирайте в автоклав при 121 °C за 15 минути.

Хранителен декстрозен агар (NDA)

Difco bacto хранителен агар, съдържащ 1 % D(+) глюкоза (монохидрат).  
Стерилизирайте в автоклав при 115 °C за 20 минути.

Пептонен глюкозен агар с дрожди (YPGA)

Екстракт от дрожди (Difco) 5,0 g

Васто-Peptide (Difco) 5,0 g

D(+) Глюкоза (монохидрат) 10,0 g

Vacto-Agar (Difco) 15,0 g

Декстилирана вода 1,0 L

Разтворете съставките и стерилизирайте в автоклав при 121 °C за 15 минути.

Среда с минерални соли и екстракт от дрожди (YGM)

Vacto-Yeast-Extract (Difco) 2,0 g

D(+) Глюкоза (монохидрат) 2,5 g

$K_2HPO_4$  0,25 g

$KH_2PO_4$  0,25 g

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,1 g

$MnSO_4 \cdot H_2O$  0,015 g

NaCl 0,05 g

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0,005 g

Vacto-Agar (Difco) 18 g

Дестилирана вода 1,0 L

Разтворете съставките и стерилизирайте 0,5 литър обеми от средата в автоклав при 115 °C за 20 минути.

*б) Валидирани селективни хранителни среди*

среда MTNA

В случай че не е упоменато друго, всички компоненти са от BDH.

Екстракт от дрожди (Difco) 2,0 g

Манитол 2,5 g

$K_2HPO_4$  0,25 g

$KH_2PO_4$  0,25 g

NaCl 0,05 g

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,1 g



MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,015 g

FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,005 g

Агар (Oxoid no. 1) 16,0 g

Дестилирана вода 1,0 L

Разтворете съставките, нагласете рН на 7,2. След загряването в автоклав (при 121 °С за 15 мин) и охлаждане до 50 °С, добавете антибиотици: trimethoprim 0,06 g, nalidixic acid 0,002 g, amphotericin B 0,01 g.

Съхранявайте разтворите на антибиотиците: trimethoprim (Sigma) и nalidixic acid (Sigma) (и двете 5 mg/ml), in 96 % methanol, amphotericin B (Sigma) (1 mg/ml) в диметиллов серен оксид. Разтворите на склад са филтърно стерилизирани.

*Бележка:*

Годността на основната среда е три месеца. След като се добавят антибиотици, трайността е един месец, ако се съхранява замразена.

NCР-88 среда

Хранителен агар (Difco) 23 g

Екстракт от дрожди (Difco) 2 g

D-манитол 5 g

K<sup>2</sup>HPO<sup>4</sup> 2 g

KH<sup>2</sup>PO<sup>4</sup> 0,5 g

MgSO<sup>4</sup>.7H<sup>2</sup>O 0,25 g

Дестилирана вода 1,0 L

Разтворете съставките, нагласете рН на 7,2. След загряването в автоклав (при 121 °С за 15 минути) и охлаждане до 50 °С, добавете следните антибиотици:

Polymyxin B sulphate (Sigma) 0,003 g, nalidixic acid (Sigma) 0,008 g, Cycloheximide (Sigma) 0,2 g.

Разтворете антибиотиците в разтвор за складиране, както следва: nalidixic acid в 0,01 M NaOH, cycloheximide в 50 % етанол, polymyxin B sulphate в дестилирана вода. Разтворите за складиране са филтърно стерилизирани.

*Бележка:*

Годността на основната среда е три месеца. След като се добавят антибиотици, трайността е един месец, ако се съхранява замразена.

#### Допълнение 6

### Валидирани PCR протоколи и реактиви

#### Бележка:

Предварителното тестване трябва да позволи възпроизводимо откриване на поне  $10^3$  до  $10^4$  клетки на *C. m. sepedonicus* на ml екстракт от проба.

Предварителното тестване трябва също да не показва положителни резултати с панел от селектирани щамове.

#### 1. Многостранини протоколи с вътрешен PCR контрол. (Patrik, 2000)

##### 1.1. Олигонуклеотидни праймери

Начален праймер PSA-1 \*\*\*[PLEASE INSERT FROM THE ORIGINAL]\*\*\*

Краен праймер PSA-R \*\*\*[PLEASE INSERT FROM THE ORIGINAL]\*\*\*

Начален праймер NS-7-F \*\*\*[PLEASE INSERT FROM THE ORIGINAL]\*\*\*

Краен праймер NS-8-R \*\*\*[PLEASE INSERT FROM THE ORIGINAL]\*\*\*

Очакваният размер на ампликона от модел на ДНК от *C. m. subsp. sepedonicus* = 502 bp (PSA-primer set).

Очакваният размер на ампликона от 18S rPHK при вътрешен контрол PCR = 377 bp (NS-primer set).

##### 1.2. PCR реакционна смес

Реактив	Количество реактиви на реакция	Крайна концентрация
Стерилна UPW	15,725 $\mu$ l	
10x PCR буфер <sup>(1)</sup> (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	2,5 $\mu$ l	1x (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
BSA (фракция V) (10 %)	0,25 $\mu$ l	0,1 %
d-нTP mix (20 mM)	0,125 $\mu$ l	0,1 mM
Праймер PSA-1 (10 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ l	0,2 $\mu$ M
Праймер PSA-R (10 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ l	0,2 $\mu$ M
Праймер NS-7-F (10 $\mu$ M) <sup>(2)</sup>	0,1 $\mu$ l	0,04 $\mu$ M
Праймер NS-8-R (10 $\mu$ M) <sup>(2)</sup>	0,1 $\mu$ l	0,04 $\mu$ M
Taq polymerase (5 U/ $\mu$ l) <sup>(1)</sup>	0,2 $\mu$ l	1,0 U
Обем на пробата	5,0 $\mu$ l	

---

Общ обем	25,0 µl
----------	---------

<sup>(1)</sup> Методите са били валидирани чрез използване на *Taq* полимераза от Perkin Elmer (AmpliТaq или Gold) и Gibco BRL.

<sup>(2)</sup> Концентрацията на праймерите NS-7 F и NS-8-R е била оптимизирана за екстракцията на конусчетата, като се използва метода на хомогенизиране и пречистване на ДНК според Pastrik (2000) (вж. раздел 6.1, буква а) и 6.2). Реоптимизиране на концентрациите от реактивите ще се изисква ако са използвани екстракция чрез разклащане или други методи за изолиране.

### 1.3. Условия на реакцията PCR

Включете следната програма:

1 цикъл: i) 3 минути при 95 °C (денатурация на матрична ДНК)

10 цикъла: ii) 1 минута при 95 °C (денатурация на матрична ДНК)

iii) 1 минута при 64 °C (хибридизация на праймерите)

iv) 1 минута при 72 °C (удължаване на копието)

25 цикъла: v) 30 секунди при 95 °C (денатурация на матрична ДНК)

vi) 30 секунди при 62 °C (хибридизация на праймерите)

vii) 1 минута at 72 °C (удължаване на копието)

1 цикъл: viii) 5 минути при 72 °C (крайно удължаване на копието)

ix) дръжте при 4 °C.

*Бележка:*

Тази програма е оптимизирана за използване с MJ Research PTC 200 термоцикълор. Може да се наложи модифициране на стъпките продължителност на циклите ii), iii) iv), v), vi) и vii) при използване на други модели.

### 1.4. Анализ на ампликона за ограничителен ензим

PCR продуктите, получени от ДНК на *S. m. subsp. sepedonicus*, дават ясно разграничим полиморфизъм на дължината на фрагмента с ензима Bgl II след инкубиране при 37 °C за 30 минути. Ограничителните фрагменти, получени от специфичен за *S. m. subsp. sepedonicus* фрагмент, са 282 bp и 220 bp по размер.

## 2. Приготвяне на буфер за електрофореза

### 2.1. Бромфенолово синьо (10 % готов разтвор)

Бромфенолово синьо 5 g

Дестилирана вода (bidest) 50 ml

## 2.2. Буфер за електрофореза

Глицерол (86 %) 3,5 ml

Бромфенолово синьо (5.1) 300 µl

Дестилирана вода (bidest) 6,2 ml

## 3. 10x Триацетат EDTA (ТАЕ) буфер, рН 8,0

Tris буфер 48,4 g

Ледена оцетна киселина 11,42 ml

EDTA (дикалиева сол) 3,72 g

Дестилирана вода 1,00 L

Разтворете до 1x преди употреба.

Налични и в търговски вид (например Invitrogen or equivalent).

Допълнение 7

## Валидирани реактиви за FISH тест

### 1. Олигосонди

Cms-специфична проба CMS-CY3-01: **\*\*\*[PLEASE INSERT FROM THE ORIGINAL]\*\*\***

Неспецифична еубактериална проба EUB-338-FITC: **\*\*\*[PLEASE INSERT FROM THE ORIGINAL]\*\*\***

### 2. Фиксиращ разтвор

*[ВНИМАНИЕ! ФИКСАТОРЪТ СЪДЪРЖА ПАРАФОРМАЛДЕХИД, КОЙТО Е ТОКСИЧЕН, НОСЕТЕ РЪКАВИЦИ И НЕ ВДИШВАЙТЕ. ПРЕПОРЪЧИТЕЛНО Е ДА СЕ РАБОТИ В ИЗОЛАЦИОННА КАМЕРА]*

i) Загрейте 9 ml вода за молекулярен анализ (например ултрачиста вода (UPW)) до около 60 °C и прибавете 0,4 g параформалдехид. Параформалдехидът се разтваря след прибавяне на пет капки 1N NaOH и разбъркване с магнитна бъркалка.

ii) Нагласете рН до 7,0 чрез прибавяне на 1ml 0,1 М фосфатен буфер (РВ; рН 7,0) и пет капки 1 N HCl. Проверете рН с индикаторна лентичка и го нагласете ако е необходимо с HCl or NaOH.

*[ВНИМАНИЕ! НЕ ИЗПОЛЗВАЙТЕ РН-МЕТЪР В РАЗТВОРИ С ПАРАФОРМАЛДЕХИД]*

iii) Филтрирайте разтвора през 0,22 µm мембранен филтър и го пазете от прах при 4 °C преди следваща употреба.

iv) *Бележка:*

Алтернативни фиксиращи разтвори: 96 % етанол.

### 3. 3x Хибмикс

NaCl 2,7 M

Tris-HCl 60 mM (pH 7,4)

EDTA (филтърно стерилизирана или на автоклав) 15 mM

Разредете до 1x, както се изисква.

### 4. Хибридизационен разтвор

1x Хибмикс

Калиев додецил сулфат (SDS) 0,01 %

проба EUB 338 5 ng/µl

проба CMSCY301 5 ng/µl

Пригответе количествата от разтвора за хибридизация според изчисленията в таблицата. За всяко предметно стъкло (съдържащо две различни проби в дубликат) се изисква 90 µl хибридизационен разтвор.

Таблица: Примерни количества за приготвяне на хибридизационна смес.

2 препарата 8 препарата

Стерилна UPW 50,1 200,4

3x хибмикс 30,0 120,0

1 % SDS 0,9 3,6

Сонда EUB 338 (100 ng/µl) 4,5 18,0

Сонда CMSCY301 (100 ng/μl) 4,5 18,0

Общ обем (μl) 90,0 360,0

*NB:* Съхранявайте всички разтвори съдържащи чувствителни на светлина олигосонди на тъмно при – 20 °С. Пазете ги от пряка слънчева светлина или електрическа светлина по време на използване.

#### **5. 0,1М Фосфатен буфер, рН 7,0**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,52 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5,44 g

Дестилирана вода 1,00 L

Разтворете съставките, проверете рН и стерилизирайте в автоклав при 121 °С за 15 минути.

*Допълнение 8*

#### **Култура от патладжан**

Посейте семена от патладжан (*Solanum melongena*) в пастьоризиран компост за семан. Пресадете покълнеците с напълно развити семедели (10- 14 дни) в пастьоризиран компост за засаждане.

Патладжанените растения трябва да са развъждат в оранжерия със следните условия на средата:

Продължителност на деня: 14 часа или естествена дневна продължителност, ако тя е по-голяма;

Температура: дневна 21- 24 °С,

нощна: 15 °С.

Чувствителни сортове патладжан: „Black Beauty“,

„Long Tom“,

„Rima“,

„Balsas“

Доставчик: вж. интернет страницата  
<http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

*Допълнение 9*

## **Грам щам процедура (поправка на Hucker's) (Doetsch, 1981)<sup>2</sup>**

### *Разтвор на кристално виолетово*

Разтворете 2 g кристално виолетово в 20 ml 95 % етанол.

Разтворете 0,8 g амониев оксалат в 80 ml дестилирана вода.

Смесете двата разтвора.

### *Луголов йодин*

Йодин 1 g

Калиев йодид 2 g

Дестилирана вода 300 ml

Смелете твърдите части заедно в хаванче с чукало. Добавете към водата и разбъркайте за да разтворите в затворен съд.

### *Шафранинов разтвор за обагряне*

Готов разтвор:

Шафранин О 2,5 g

95 % етанол 100 ml

Разбъркайте и съхранете.

Разредете 1:10 за да получите работен разтвор.

### *Багрилна процедура*

1. Пригответе натривки, изсушете на въздух и фиксирайте с топлина.
2. Залейте предметното стъкло с разтвор на кристално виолетово за 1 минута.
3. Изплакнете бързо на чешмяна вода.
4. Залейте с луголов йодин за 1 минута.
5. Изплакнете на чешмяна вода и попейте.

---

<sup>2</sup> Могат да се използват и търговски разтвори и комплекти за оцветяване.

6. Обезцветете с 95 % етанол, като добавяте внимателно докато не се извлича повече цвят или имерсирайте с леко разклащане за 30 секунди.

7. Изплакнете на чешмяна вода и попейте.

8. Залейте с шафранинов разтвор до 10 секунди.

9. Изплакнете на чешмяна вода и попейте.

Грам положителните бактерии се оцветяват във виолетово-синьо; грам отрицателните бактерии се оцветяват в розово-червено.

## **ЛИТЕРАТУРА**

\*\*\*[PLEASE INSERT FROM THE ORIGINAL]\*\*\*



## *ПРИЛОЖЕНИЕ II*

1. За всяко предполагаемо наличие, за което е бил определен положителен резултат от скрининг теста/овете според методите, описани в приложение I, и за което се очаква потвърждение или опровержение чрез упоменатите методи, трябва да има задържане и подходящо съхраняване на:

- всички клубени, от които са взети проби, и всички растения, от които са взети проби,

- всякакъв останал екстракт и допълнително приготвен материал за скрининг ттеста/овете, например препарати за имунофлуоресценция,

и

- цялата свързана с това документация,

до зъвършването на упоменатите методи.

Задържането на клубените ще позволи да се извърши сортоизпитване, ако е необходимо.

2. В случай на положително потвърждение на организма, трябва да има задържане и подходящо съхраняване на

- материала, описан в точка 1,

и

- проба от заразеният материал от патладжан, инжектиран с екстракт от клубен или растение, и
- изолираната култура от организма, най-малко до един месец след процедурата по нотификация съгласно член 5, параграф 2.

### *ПРИЛОЖЕНИЕ III*

1. Елементите, които трябва да вземат предвид при определянето на степента на възможното заразяване съгласно член 5, параграф 1, буква б) трябва да включват:

- клубени или растения, отгледани на мястото на производство, обозначено като заразено съгласно член 5, параграф 1, буква а),
- мястото/местата на производство с някаква производствена връзка с клубените или растенията, обозначени като заразени съгласно член 5, параграф 1, буква а), включително които имат общо производствено оборудване и съоръжения, пряко или чрез общ предприемач,
- клубени или растения, произведени на мястото/местата на производство, упоменати в предишното тире, или представени на такива производствени места по времето, когато клубените или растенията, обозначени като заразени съгласно член 5, параграф 1, буква а), са били представени на мястото на производство, упоменато в първото тире,
- сградите за обработка на картофи от местата на производство, упоменати в горните тирета,
- всички машини, превозни средства, съдове, складове, или части от тях и всякакви други предмети, включително опаковъчен материал, който може да е бил в контакт с клубени или растения, обозначени като заразени съгласно член 5, параграф 1, буква а),

- всички клубени или растения, съхранявани или в контакт с която и да е част от или предметите, описани в предишното тире, преди почистването и дезинфекцирането на тези части или предмети,

- като резултат от тестването съгласно член 6, тези клубени или растения, свързани на едно ниво или клоново с клубените или растенията, обозначени като заразени съгласно член 5, параграф 1, буква а) и за които, въпреки че резултатите са били отрицателни за организма, изглежда, че заразата е вероятна чрез клонова връзка. Може да се предприеме сортоизпитване, за да се определи идентичността на заразените и клоново свързани клубени и растения,

и

- местата на производство на клубени или растения, упоменати в предишното тире.

2. Елементите, които трябва да бъдат взети предвид при определянето на възможното разпространение съгласно член 5, параграф 1, буква в), трябва да включват:

- близостта на други места за производство и отглеждане на картофи или други растения-гостоприемници,

- общото производство и използване на запаси от картофи за семе.

3. Нотификацията, посочена в 5, параграф 2, първа алинея, трябва да бъде изпратена, както следва:

- незабавно, след като наличието на организма е било потвърдено чрез лабораторното тестване, чрез използване на методите, описани в приложение I, но поне:

- името на сорта на партидата от картофи,

- типа (за преработка и консумация, за семе, др.) и, където е приложимо, категорията семе на картофите.

- когато съществува риск от заразяване на картофите от или в друга/и държава/и-членка/и, държавата-членка, в която е било потвърдено наличието трябва незабавно да уведоми заинтересованите държави-членки за нужната информация, за да се отговори на член 5, параграф 3, а именно:

- името на сорта на партидата от картофи,

- името и адреса на търговеца, който изпраща пратката, и на търговеца, който я получава,

- датата на доставка на пратката от картофи,

- размера на доставената пратка от картофи,
- копие от растителния паспорт или поне номера на растителния паспорт, където е приложимо, или, където е приложимо, регистрационния номер на производителя или търговеца и копие от известието за доставяне.

Комисията трябва да бъде уведомявана незабавно, след като тази информация е била предоставена.

- След като е било приключено разследването, за всеки от случаите:
  - за датата, на която е било потвърдено заразяването,
  - кратко описание на разследването, проведено за да се идентифицира източникът и възможното разпространение на заразата, включително нивото на предприетото пробовземане,
  - информация за идентифицираните или предполагаеми източници на зараза,
  - подробности за степента на обозначената зараза, включително броя на местата за производство и броя на партиди с индикация за сорта, а ако са картофи за семе, за категорията,
  - подробности за демаркационната зона, включително броя на местата за производство, които не са обозначени като заразени, но са включени в зоната,
  - всякаква друга информация, имаща връзка с потвърденото огнище/а, която Комисията може да изиска.

#### ПРИЛОЖЕНИЕ IV

1. Официално съблюдаваните мерки, цитирани в член 7, параграф 1, трябва да са:

- използването за фураж на животните след термична обработка, така че да няма риск от оцеляване на организма,

или

- загробване на официално одобрено за целта място за загробване на отпадък, на което не съществува идентифицируем риск за изпускане на патогена в околната среда, например чрез просмукване към земеделски земи,

или

- изгаряне,

или

- промишлена преработка чрез директна и незабавна доставка на преработвателно предприятие с официално одобрени съоръжения за съхранение на отпадъците, за които е било установено, че не съществува идентифицируем риск от разпространение на организма, и със система за почистване и дезинфекция поне на излизащите от него превозни средства,

или

- други мерки, при условие че е било установено, че не съществува идентифицируем риск от разпространение на организма; тези мерки и

удостоверяването им да бъдат нотифицирани на Комисията и на другите държави-членки.

Всички оставащи отпадъци, свързани или произлизащи от горните, трябва да бъдат съхранявани по официално одобрените методи в съответствие с приложение V към настоящата директива.

2. Правилната употреба или изхвърляне на клубени или растения, определени като вероятно заразени съгласно член 5, параграф 1, буква б) и назовани в член 7, параграф 2, под контрола на официално отговорните органи на заинтересованите държави-членки, с правилната комуникация между официално отговорните органи да гарантира такъв контрол през цялото време и одобрение от официално отговорните органи на държавата-членка, където ще се опаковат или преработват картофите по отношение на съоръжения за съхранение на отпадъците, цитирани в първо и второ тире, трябва да са:

- използване като картофите за преработка и консумация, опаковани готови за доставка и употреба без повторно опаковане, на място с подходящи съоръжения за съхраняване на отпадъците. С картофите, предназначени за засаждане, може да се борави на същото място, ако това се прави отделно или след почистване и дезинфекция,

или

- използване като картофите за преработка и консумация, предназначени за промишлена преработка и предназначени за директна и незабавна доставка до преработвателя завод с подходящи съоръжения за съхранение на отпадъците и система за почистване и дезинфекция най-малкото на превозните средства, напускащи мястото,

или

- някаква друга употреба или изхвърляне, при условие че е установено, че няма идентифицируем риск от разпространение на организма и е подлежат на одобрение от упоменатите официално отговорни органи.

3. Правилните методи за почистване и дезинфекциране на предметите, цитирани в член 7, параграф 3, трябва да бъдат тези, за които е било установено, че няма идентифицируем риск от разпространение на организма и ще бъдат използвани съгласно надзора на официално отговорни органи на държавите-членки.

4. Серията от мерки, които да бъдат изпълнявани от държавите-членки в рамките на демаркираната зона, установена съгласно член 5, параграф 1, буква в) и цитирани в член 7, параграф 4, трябва да включват:

4.1. на местата за производство, обозначени като заразени съгласно член 5, параграф 1, буква а):

а) в поле, обозначено като заразено съгласно член 5, параграф 1, буква а), или

і) - по време на поне 3-те години след годината на обозначеното заразяване,

- трябва да бъдат взети мерки за да се елиминират самосевки от картофени растения и други естествено намирани растения-гостоприемници на организма,

и

- да не се засаждат картофени клубени, растения или същински семена или други естествено намиращи се растения-гостоприемници на организма, или култури, за които съществува идентифицируем риск от разпространение на организма,

- в сезона на първата реколта от картофи, следваща периода, описан в предишното тире и при условие че за полето е било установено, че е свободно от самосевки и други естествено намиращи се растения-гостоприемници на организма по време на инспекциите за поне две последователни години на отглеждане, предхождащи засаждането, ще бъде разрешено само производство на картофи за консумация и преработка, а прибраните клубени трябва да се тестват според процедурата, описана подробно в приложение I;

- в сезона на прибиране на реколтата от картофи, следващ този, цитиран в предишното тире и следващ подходящ цикъл на сеитбообращение, който ще бъде поне две години, ако ще се отглеждат картофи за семе, могат да се засаждат картофи за производство на картофи за семе или консумация и преработка и ще се извършва официално наблюдение, както е описано в член 2, параграф 1; или

ii) - по време на четирите години на отглеждане, следващи годината на обозначено заразяване,

- трябва да бъдат взети мерки, за да се елиминират самосевки от картофени растения или други естествено намиращи се растения гостоприемници на организма,

и

- полето трябва да бъде заложено и поддържано или за угар или за постоянна паша, с често ниско окосяване или интензивна паша,

- в сезона на първата реколта, следваща периода, описан в предишното тире и при условие че за полето е било установено, че е свободно от самосевки от картофени растения и други естествено намиращи се растения-гостоприемници на организма по време на официалните инспекции за поне две последователни години на отглеждане, предхождащи засаждането, ще бъде разрешено производството на картофи за семе, преработка и консумация и прибраните клубени трябва да се тестват съгласно процедурите, описани в приложение I;

б) във всички други полета на заразено място на производство и при условие че официално отговорните органи са били убедени, че рискът самосевки от картофени растения и други естествено намиращи се растения-гостоприемници на организма е бил елиминиран:

- в годината на отглеждане, следваща тази на обозначеното заразяване, не трябва да се засаждат нито картофени клубени, нито картофени растения или същински семена, нито други естествено намиращи се растения гостоприемници на организма, или

- могат да се засаждат сертифицирани картофи за семе, но само за производство на картофи за преработка и консумация,

- във втората година на отглеждане, следваща тази на обозначеното заразяване, трябва да се засаждат само сертифицирани картофи за семе или картофи за семе, официално тествани за отсъствие на пръстеновидно гниене и отглеждани под официален контрол на места за производство, различни от тези, посочени в 4.1, за производство на картофи за семе, преработка и консумация,

- за поне третата година на отглеждане, следваща годината на обозначеното заразяване, трябва да бъдат засаждани само сертифицирани картофи за семе или картофи за семе под официален контрол от сертифицирани картофи за семе, за производство на картофи за семе, преработка и консумация.

- във всяка от годините на отглеждане, назовани в предните подточки, трябва да се вземат мерки, за да се елиминират самосевки от картофени растения и други естествено намиращи се растения-гостоприемници на организма, ако такива съществуват, и във всяко поле ще се извършва официално тестване на реколтата от картофи според процедурите, подробно описани в приложение I,

в) незабавно след обозначаването на заразата съгласно 5, параграф 1, буква а) и след първата последваща година на отглеждане, всички машини и складови съоръжения на мястото на производство и включени в производството на картофи, трябва да бъдат подходящо почистени и дезинфекцирани, като се използват подходящите методи, както е описано в 3;

г) в единица за производство на реколтата от защитена култура, където е възможна пълна смяна на средата за отглеждане,

- не трябва да се засаждат клубени, растения или същински семена, освен ако единицата за производство не е била обект на официално съблюдавани мерки, за да се елиминира организъмът и да се отстрани материала от всички растения-гостоприемници, включително най-малкото смяна на средата на отглеждане и почистване и дезинфекция на единицата за производство и цялото оборудване, и в следствие е било дадено одобрение за производство на картофи от официално отговорните органи,

и



- производството на картофи трябва да бъде от сертифицирани картофи за семе, или от миниклубени или микрорастения, получени от тествани източници;

4.2. в рамките на демаркационната зона, без да се нарушават мерките, описани съгласно 4.1, държавите-членки трябва:

а) незабавно след обозначаването на заразяването, да гарантират, че всички машини и съоръжения за съхранение на тези места и включени в производството на картофи, ще бъдат подходящо почистени и дезинфекцирани, като се използват подходящите методи, както е описано в 3;

б) незабавно и минимум за поне три сезона на отглеждане след обозначаване на заразата:

- да гарантират надзор от техните официално отговорни органи на местата за отглеждане, съхранение или обработка на картофени клубени, заедно с местата, в които се работи с машини на договор,

- да изискват засаждането само на сертифицирани семена или семена, отглеждани под официален контрол за всички картофени култури в рамките на тази зона, и тестване след прибирането на реколтата от картофи за семе, отглеждани в местата на производство, обозначени като вероятно заразени съгласно член 5, параграф 1, буква б),

- да изискват разделно обработване на прибраните запаси от картофи за семе от тези за преработка и консумация на всички места в зоната или система за почистване и дезинфекция, които да бъдат извършвани между обработките на запасите от картофи за семе и тези за преработка и консумация,

- да провеждат официални наблюдения, както е описано в член 2, параграф 1;

в) да въведе програма, където е уместно, за смяна на всички запаси от картофи за семе на подходящ период от време.

## *ПРИЛОЖЕНИЕ V*

Официално одобрените методи за отлагане на отпадъците, посочени в приложение IV, точка 1, трябва да отговарят на следните разпоредби, така че да се избегне всякакавъ идентифицируем риск от разпространение на организма:

i) отпадъци от картофи (включително изхвърлените картофи и обелки) и всякакви други твърди отпадъци, свързвани с картофите (включително почва, камъни и други остатъци), трябва да бъдат изхвърляни чрез,

- отлагане на официално одобрено за целта място за отлагане на отпадъци, на което няма идентифицируем риск от преминаване на организма в околната среда, например чрез просмукване към земеделска земя. Отпадъците трябва да бъдат директно отвеждани към мястото в съхранени условия, така че да няма риск от загуба или разпиляване,

или,

- изгаряне,

или

- други мерки, при условие че е било установено, че няма идентифицируем риск от разпространение на организма; тези мерки трябва да бъдат нотифицирани/известени на Комисията и на държавите-членки.

ii) течни отпадъци: преди отлагането им течните отпадъци, съдържащи утаени твърди частици, трябва да бъдат подложени на филтрация или разделителен процес, за да се отстранят тези твърди частици. Тези твърди частици трябва да бъдат отложени така, както е определено в i).

Течните отпадъци трябва следователно да бъдат:

- загрети до минимум 60 °C през целия обем по време на поне 30 минути преди отлагането,

или

- отложени по друг начин, подлежащ на официално одобрение и под официален контрол, така че да няма идентифицируем риск, че отпадъците могат да влязат в контакт със земеделска земя. Подробностите за това трябва да бъдат оповестени на другите държави-членки и на Комисията.

Възможностите, описани в настоящото приложение, също се прилагат за отпадъците, свързани с боравенето, преработката и отлагането на замърсените пратки.