

DYREKTYWA KOMISJI 2006/63/WE**z dnia 14 lipca 2006 r.****zmieniająca załączniki II–VII do dyrektywy Rady 98/57/WE w sprawie kontroli organizmu *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.***

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

uwzględniając Traktat ustanawiający Wspólnotę Europejską,

uwzględniając dyrektywę Rady 98/57/WE z dnia 20 lipca 1998 r. ⁽¹⁾ w sprawie kontroli *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, w szczególności jej art. 11,

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) Jednym z głównych organizmów szkodliwych dla ziemniaka i pomidora jest bakteria *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* (zwana dalej „organizmem”), powodująca chorobę zwaną śluzakiem.
- (2) Organizm wciąż występuje w niektórych częściach terytorium Wspólnoty.
- (3) Dyrektywa 98/57/WE ustanowiła szczegółowe środki do podjęcia przez państwa członkowskie przeciwko organizmowi dla jego zlokalizowania i określenia zasięgu jego występowania; niedopuszczenia do jej wystąpienia i rozprzestrzeniania się oraz – w przypadku stwierdzenia obecności tego organizmu – zabezpieczenia przed jego rozprzestrzenianiem się i jego zniszczenia przez usunięcie roślin z korzeniami.
- (4) Od tamtego czasu poczyniono znaczne postępy w rozumieniu biologii, procedurach wykrywania i identyfikacji organizmu; ponadto doświadczenie praktyczne uzyskane w trakcie kontroli organizmu wymaga rewizji kilku przepisów technicznych związanych ze środkami kontroli.
- (5) W wyniku wspomnianych postępów wydaje się, że należy zrewidować i zaktualizować środki będące przedmiotem niektórych załączników do dyrektywy 98/57/WE.
- (6) W odniesieniu do procedur wykrywania i identyfikacji uwzględniono nowoczesną metodę wykrywania: test FISH, czyli fluorescencyjną hybrydyzację *in situ*. Uwzględniono również udoskonalony test PCR oraz ulepszone różne

techniczne elementy aktualnej procedury wykrywania i identyfikacji, a także metody wykrywania i identyfikacji organizmu w roślinach żywicielskich innych niż ziemniaki oraz w wodzie i glebie.

- (7) Jeśli chodzi o techniczne elementy środków zwalczania choroby, zmieniono przepisy dotyczące: sposobu przechowywania badanych prób, dla zapewnienia śledzenia porażenia, elementów potrzebnych do określenia zasięgu prawdopodobnego porażenia, szczegółów powiadamiania o wszelkich potwierdzonych przypadkach występowania organizmu oraz o strefach porażenia, środków, które należy wprowadzić w miejscach produkcji określonych jako porażone, a znajdujących się w obrębie wyznaczonych stref. Ponadto dołączono pewne postanowienia dotyczące pomidorów, tak aby w większym stopniu uwzględnić znaczenie tej rośliny jako żywiciela organizmu.

- (8) Środki przewidziane w niniejszej dyrektywie są zgodne z opinią Stałego Komitetu ds. Zdrowia Roślin,

PRZYJMUJE NINIEJSZĄ DYREKTYWĘ:

Artykuł 1

Załączniki II–VII do dyrektywy 98/57/WE zastępuje się odpowiednimi tekstami znajdującymi się w Załączniku do niniejszej dyrektywy.

Artykuł 2

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

Państwa członkowskie stosują wymienione przepisy od dnia 1 kwietnia 2007 r.

Przepisy przyjęte przez państwa członkowskie zawierają odniesienie do niniejszej dyrektywy lub odniesienie takie towarzyszy ich urzędowej publikacji. Sposoby dokonywania takiego odniesienia określone są przez państwa członkowskie

⁽¹⁾ Dz.U. L 235 z 21.8.1998, str. 1.

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

Artykuł 3

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

Artykuł 4

Niniejsza dyrektywa skierowana jest do państw członkowskich.

Sporządzono w Brukseli, dnia 14 lipca 2006 r.

W imieniu Komisji
Markos KYPRIANOU
Członek Komisji

ZAŁĄCZNIK

„ZAŁĄCZNIK II

SCHEMAT BADANIA DIAGNOSTYCZNEGO, WYKRYWANIA ORAZ IDENTYFIKACJI RALSTONIA SOLANACEARUM (SMITH) YABUUCHI ET AL.

ZAKRES BADANIA

Przedstawiony schemat opisuje różne procedury odnoszące się do:

- i) diagnostyki śluzaka w bulwach ziemniaka oraz w roślinach ziemniaka i pomidora i niektórych innych roślinach żywicielskich;
- ii) wykrywania *Ralstonia solanacearum* w próbach bulw ziemniaka, roślinach ziemniaka, pomidora i w innych roślinach żywicielskich, oraz w wodzie i glebie;
- iii) identyfikacji *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*).

SPIS TREŚCI

	Strona
	Zasady ogólne
	40
SEKCJA I:	Zastosowanie schematu badania
	40
	1. Schemat diagnostyki śluzaka (<i>R. solanacearum</i>) w bulwach ziemniaka oraz w bulwach ziemniaka oraz roślinach ziemniaka, pomidora lub innych roślinach żywicielskich z objawami śluzaka lub wędnięcia bakteryjnego
	40
	2. Schemat wykrywania oraz identyfikacji <i>R. solanacearum</i> w bezobjawowych próbach bulw ziemniaka
	43
	3. Schemat wykrywania oraz identyfikacji <i>R. solanacearum</i> w bezobjawowych próbach bulw ziemniaka, pomidora lub innych roślin żywicielskich
	46
SEKCJA II:	Szczegółowe metody wykrywania <i>R. solanacearum</i> w bulwach ziemniaka i roślinach ziemniaka, pomidora lub innych roślinach żywicielskich z objawami śluzaka lub wędnięcia bakteryjnego
	48
	1. Objawy
	48
	2. Szybkie testy przesiewowe
	48
	3. Posiew na podłoża selektywne
	49
	4. Testy identyfikacyjne dla <i>R. solanacearum</i>
	49
SEKCJA III:	1. Szczegółowe metody wykrywania i identyfikacji <i>R. solanacearum</i> w próbach bezobjawowych bulw ziemniaka
	49
	1.1. Przygotowanie próby
	49
	1.2. Badanie
	51
	2. Szczegółowe metody wykrywania i identyfikacji <i>R. solanacearum</i> w próbach bezobjawowych ziemniaka, pomidora lub innych roślin
	51
	2.1. Przygotowanie próby
	51
	2.2. Badanie
	52
SEKCJA IV:	1. Schemat wykrywania i identyfikacji <i>R. solanacearum</i> w wodzie
	53
	2. Metody wykrywania i identyfikacji <i>R. solanacearum</i> w wodzie
	55
	2.1. Przygotowanie próby
	55
	2.2. Badanie
	55
SEKCJA V:	1. Schemat wykrywania i identyfikacji <i>R. solanacearum</i> w glebie
	56
	2. Metody wykrywania i identyfikacji <i>R. solanacearum</i> w glebie
	58
	2.1. Przygotowanie próby
	58
	2.2. Badanie
	58

	Strona
SEKCJA VI: Zoptymalizowane protokoły wykrywania i identyfikacji <i>R. solanacearum</i>	58
A. Testy diagnostyczne i wykrywanie	58
1. Badanie na obecność wycieków z wiązek przewodzących łodygi	58
2. Badanie na obecność granulek poly- β -hydroksymaślanu	58
3. Test aglutynacji serologicznej	59
4. Izolacja selektywna	60
4.1. Izolacja na podłoże selektywne	60
4.2. Procedura wzbogacenia	60
5. Test immunofluorescencyjny (test IF)	61
6. Reakcja łańcuchowa polimerazy (test PCR)	64
6.1. Metody oczyszczania DNA	65
a) Metoda zgodnie z Pastrok (2000)	65
b) Inne metody	65
6.2. PCR	66
6.3. Analiza produktu PCR	66
7. Hybrydyzacja fluorescencyjna <i>in situ</i> (test FISH)	67
8. Testy immunoenzymosorbcyjne (testy ELISA)	69
a) ELISA pośrednie	69
b) DASI ELISA (test ELISA sandwichowy pośredni)	70
9. Test biologiczny	71
B. Testy identyfikacyjne	72
1. Testy fizjologiczne i biochemiczne	72
2. Test IF	72
3. Test ELISA	73
4. Test PCR	73
5. Test FISH	73
6. Analiza kwasów tłuszczowych (FAP)	73
7. Metoda oznaczania szczepu	73
7.1. Określenie biowaru	73
7.2. Genomowe fingerprinting	74
7.3. Metody PCR	74
C. Testy potwierdzające	74
Dodatek 1 Laboratoria zajmujące się optymalizacją i zatwierdzeniem protokołów	76
Dodatek 2 Pożywki do izolacji i hodowli <i>R. solanacearum</i>	77
Dodatek 3 A. Dostępne w handlu znormalizowane materiały kontrolne	79
B. Przygotowanie kontroli	80
Dodatek 4 Skład buforów i sposób ich przygotowania	82
Dodatek 5 Określenie poziomu porażenia w testach IF i FISH	85
Dodatek 6 Zatwierdzone protokoły PCR i odczynniki	86
Dodatek 7 Zatwierdzone odczynniki do testu FISH	91
Dodatek 8 Hodowla obojętnej i pomidora	93
Literatura	94

ZASADY OGÓLNE

Dodatki zawierają zoptymalizowane protokoły dla różnych metod, zatwierdzonych odczynników i danych szczegółowych dotyczących przygotowania badania i materiałów kontrolnych. Dodatek 1 zawiera spis laboratoriów uwzględnionych w optymalizacji i zatwierdzeniu protokołów.

W związku z tym, że protokoły obejmują wykrywanie organizmu poddanego kwarantannie i wykorzystanie kultur żywych *R. solanacearum* jako materiału kontrolnego, konieczne będzie wykonanie procedur w odpowiednich warunkach kwarantanny przy użyciu odpowiednich urządzeń do usuwania odpadów oraz będąc w posiadaniu odpowiednich pozwoleń wydanych przez władze rządowe odpowiedzialne za kwarantannę roślin.

Parametry badania muszą zapewnić zgodne i dające się odtworzyć wykrycie różnych poziomów *R. solanacearum* przy użyciu określonych wartości progowych wybranych metod.

Niezbędne jest dokładne przygotowanie pozytywnych kontroli

Przeprowadzanie badań zgodnie z wymaganymi wartościami progowymi zakłada również właściwe ustawienia, utrzymanie oraz kalibrację urządzeń, ostrożne obchodzenie się i przechowywanie odczynników i wszystkie środki niezbędne dla zapobiegnięcia kontaminacji próbek, np. oddzielenie kontroli pozytywnych od prób badanych. Dla uniknięcia błędów administracyjnych i innych błędów należy przestrzegać norm kontroli jakości, zwłaszcza dotyczących etykietowania i dokumentacji.

Podjęcie o wystąpieniu opisane w art. 4 ust. 2 dyrektywy 98/57/WE oznacza pozytywny wynik badań diagnostycznych lub przesiewowych wykonanych na próbce zgodnie z tym, co określono na poniższych schematach blokowych. Pozytywne pierwsze badanie przesiewowe (badanie IF, PCR/FISH, izolacja selektywna) musi zostać potwierdzone drugim badaniem przesiewowym w oparciu o inną zasadę biologiczną.

Jeżeli pierwsze badanie przesiewowe da wynik pozytywny, wówczas istnieje podejrzenie porażenia *R. solanacearum* i należy wykonać drugie badanie przesiewowe. Jeżeli drugie badanie przesiewowe da wynik pozytywny, wówczas podejrzenie zostaje potwierdzone (podejrzenie występowania) i należy wykonywać badania zgodnie ze schematem. Jeśli drugie badanie przesiewowe da wynik negatywny, wówczas próbę uznaje się za nieporażoną *R. solanacearum*.

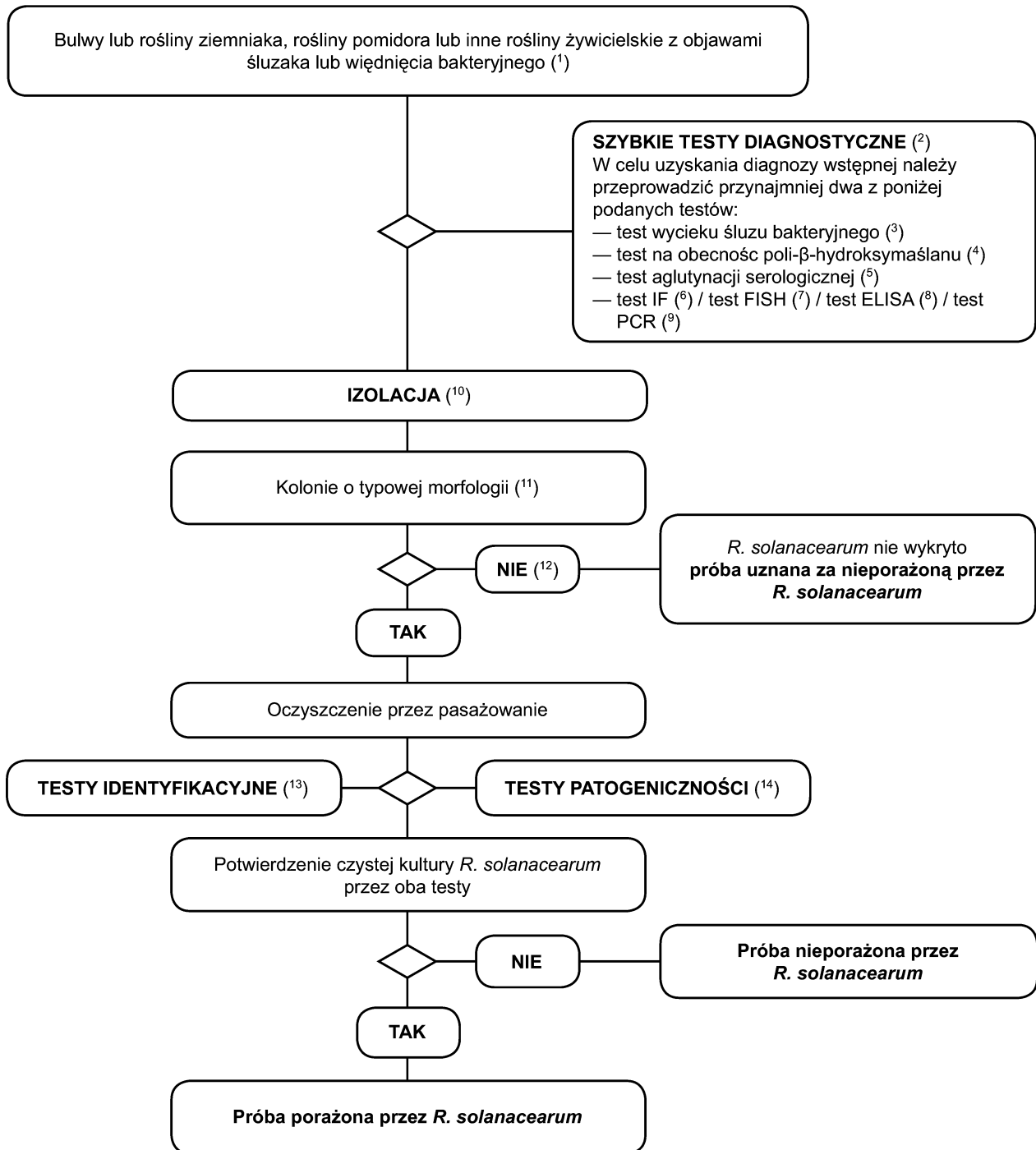
Potwierdzenie obecności porażenia, o której mowa w art. 5 ust. 1 dyrektywy 98/57/WE, oznacza wyizolowanie i zidentyfikowanie czystej kultury *R. solanacearum* z potwierdzeniem patogenności.

SEKCJA I

SCHEMAT BADANIA

1. Schemat diagnozowania śluzaka w bulwach ziemniaka oraz *R. solanacearum* w bulwach ziemniaka oraz w roślinach ziemniaka, pomidora lub innych roślinach żywicielskich z objawami śluzaka lub wędnięcia bakteryjnego

Procedura badania jest przeznaczona dla bulw ziemniaka i roślin z objawami śluzaka lub wędnięcia bakteryjnego. Procedura ta obejmuje szybkie badanie przesiewowe, izolację patogenu z porażonej tkanki naczyniowej na pożywkę diagnostyczną (selektywną) oraz, w przypadku wyniku pozytywnego, identyfikację kultury jako *Ralstonia solanacearum*.



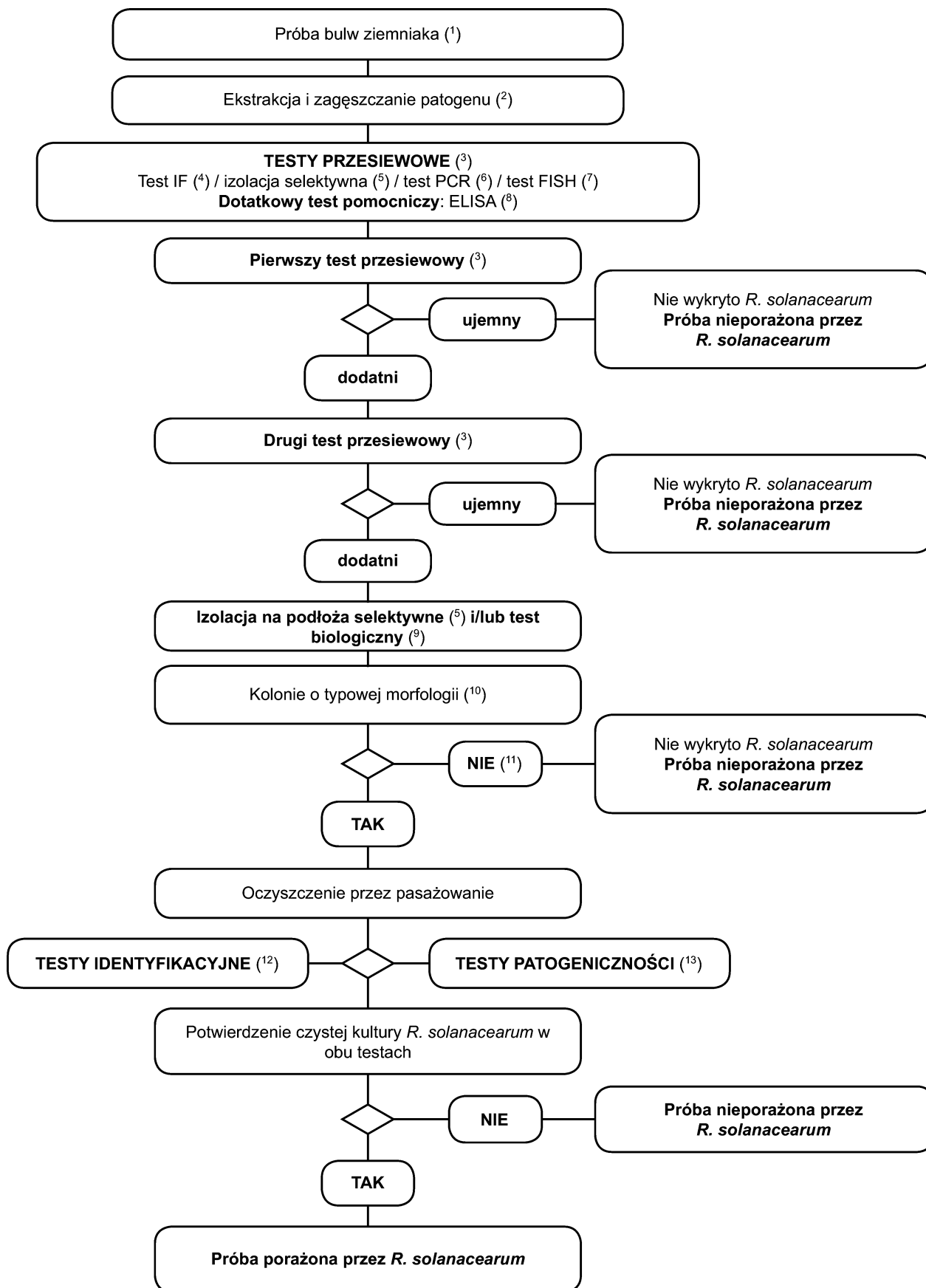
- (¹) Opis objawów znajduje się w sekcji II.1.
- (²) Szybkie badania przesiewowe ułatwiają wstępną diagnozę, lecz nie są niezbędne. Wynik pozytywny nie zawsze jest gwarancją nieobecności patogenu.
- (³) Test wycieku śluzu bakteryjnego z tkanki naczyniowej łodygi został opisany w sekcji VI.A.1.
- (⁴) Test na obecność granulek poli- β -hydroksymaślanu w komórkach bakteryjnych został opisany w sekcji VI.A.2.
- (⁵) Test aglutynacji serologicznej na śluzie bakteryjnym lub ekstrakcie tkanki symptomatycznej został opisany w sekcji VI.A.3.
- (⁶) Test IF na śluzie bakteryjnym zawieszonym w wodzie lub ekstraktach tkanki symptomatycznej został opisany w sekcji VI.A.5.
- (⁷) Test FISH na śluzie bakteryjnym zawieszonym w wodzie lub ekstraktach tkanki symptomatycznej został opisany w sekcji VI.A.7.
- (⁸) Test ELISA na śluzie bakteryjnym zawieszonym w wodzie lub ekstraktach tkanki symptomatycznej został opisany w sekcji VI.A.8.
- (⁹) Test PCR na śluzie bakteryjnym zawieszonym w wodzie lub ekstraktach tkanki symptomatycznej został opisany w sekcji VI.A.6.
- (¹⁰) Izolacja patogenu z materiału roślinnego o typowych objawach chorobowych metodą rozcieńczeń płytkowych przez jest zazwyczaj metodą prostą (sekcja II.3).
- (¹¹) Kolonia o typowej morfologii została opisana w sekcji II.3.d.
- (¹²) Hodowanie kultury może nie powieść się, poczynając od zaawansowanych stadiów porażenia, z powodu konkurencji lub nadmiernego wzrostu bakterii saprofitycznych. Jeśli objawy chorobowe są typowe, lecz badanie izolacji daje wynik negatywny, wówczas należy izolację powtórzyć, najlepiej przy pomocy posiewu na podłoże selektywne.
- (¹³) Wiarygodną identyfikację czystej kultury *Ralstonia solanacearum* otrzymuje się przy zastosowaniu badań wyszczególnionych w sekcji VI.B. Podspecyficzna charakterystyka jest fakultatywna, lecz zaleca się ją dla każdego nowego przypadku.
- (¹⁴) Test patogeniczności został opisany w sekcji VI.C.

2. Schemat wykrywania oraz identyfikacji *Ralstonia solanacearum* w bezobjawowych próbach bulw ziemniaka

Zasada:

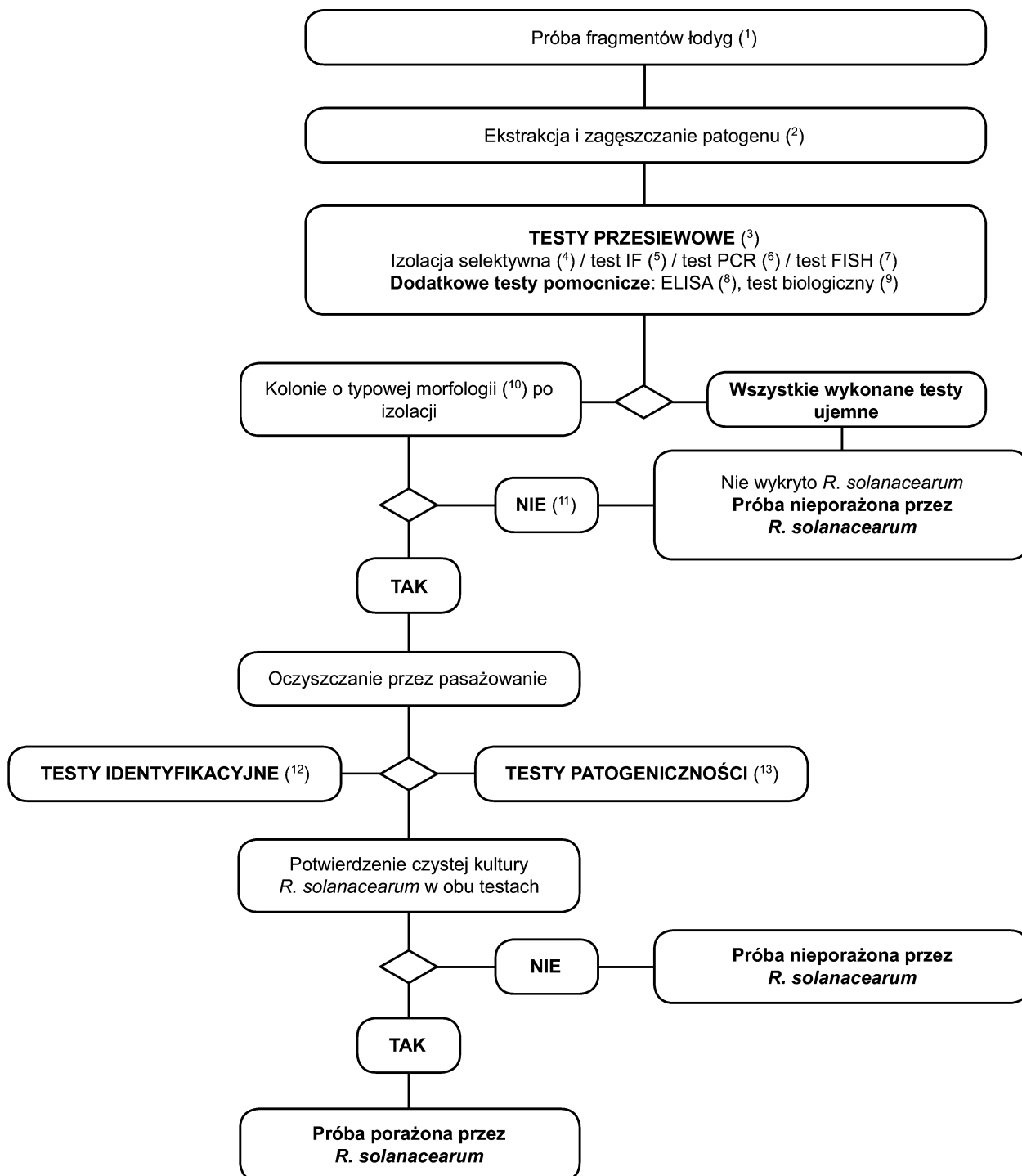
Procedura badania przeznaczona jest do wykrywania utajonych infekcji bulw ziemniaka. W przypadku wyniku pozytywnego przynajmniej dwóch badań przesiewowych³, w oparciu o różne zasady biologiczne, procedura musi zostać uzupełniona izolacją patogenu, po której wykonane zostaje – w przypadku izolacji typowych kolonii – potwierdzenie czystej kultury jako *R. solanacearum*. Pozytywny wynik tylko jednego badania przesiewowego nie jest wystarczający dla stwierdzenia, że próba jest podejrzana.

Badania przesiewowe i badania izolacji muszą pozwolić na wykrycie od 10^3 do 10^4 komórek/ml zawieszonego osadu, w kontroli pozytywnej załączonej do każdej serii badań.



- (¹) Standardowa wielkość próby to 200 bulw, chociaż można zastosować procedurę przy mniejszej liczbie próby, jeśli 200 bulw nie jest dostępnych.
- (²) Metody ekstrakcji i zagęszczania patogenu zostały opisane w sekcji III.1.1.
- (³) Jeżeli przynajmniej dwa badania w oparciu o różne zasady biologiczne są pozytywne, należy przeprowadzić izolację i potwierdzenie. Należy wykonać przynajmniej jedno badanie przesiewowe. Gdy wynik badania jest negatywny, próbę uważa się za negatywną. Jeżeli badanie da wynik pozytywny, wymagane jest wykonanie drugiego lub większej ilości badań przesiewowych w oparciu o różne zasady biologiczne dla zweryfikowania pierwszego pozytywnego wyniku. Jeśli drugie lub pozostałe badania są negatywne, próbę uważa się za negatywną. Nie ma konieczności wykonywania dalszych badań.
- (⁴) Test IF został opisany w sekcji VI.A.5.
- (⁵) Izolacja na podłoża selektywne została opisana w sekcji VI.A.4.
- (⁶) Test PCR został opisany w sekcji VI.A.6.
- (⁷) Test FISH został opisany w sekcji VI.A.7.
- (⁸) Test ELISA został opisany w sekcji VI.A.8.
- (⁹) Test biologiczny został opisany w sekcji VI.A.9.
- (¹⁰) Kolonia o typowej morfologii została opisana w sekcji II.3.d.
- (¹¹) Hodowla lub test biologiczny mogą się nie powieść z powodu konkurencji lub inhibicji przez bakterie saprofityczne. Jeśli w badaniach przesiewowych uzyska się wyraźne pozytywne wyniki, lecz badania izolacji są negatywne, należy powtórzyć badania izolacji z tego samego zawieszono osadu lub poprzez pobranie dodatkowej tkanki roślinnej z części przystolonowych przeciętej bulwy tej samej próby oraz, w razie potrzeby, przebadanie dodatkowych prób.
- (¹²) Wiarygodną identyfikację czystej kultury *Ralstonia solanacearum* otrzymuje się przy zastosowaniu badań wyszczególnionych w sekcji VI.B.
- (¹³) Test patogeniczności został opisany w sekcji VI.C.

3. Schemat wykrywania oraz identyfikacji *Ralstonia solanacearum* w bezobjawowych próbach roślin ziemniaka, pomidora lub innych roślin żywicielskich.



- (¹) Zalecane rozmiary próby znajdują się w sekcji III.2.1.
- (²) Metody ekstrakcji i zagęszczania patogenu zostały opisane w sekcji III.2.1.
- (³) Jeżeli przynajmniej dwa badania w oparciu o różne zasady biologiczne są pozytywne, należy przeprowadzić izolację i potwierdzenie. Należy wykonać przynajmniej jedno badanie przesiewowe. Gdy wynik badania jest negatywny, próbę uważa się za negatywną. Jeżeli badanie da wynik pozytywny, wymagane jest wykonanie drugiego lub większej ilości badań przesiewowych w oparciu o różne zasady biologiczne dla zweryfikowania pierwszego pozytywnego wyniku. Jeśli drugie lub pozostałe badania są negatywne, próbę uważa się za negatywną. Nie ma konieczności wykonywania dalszych badań.
- (⁴) Izolacja na podłoża selektywne została opisana w sekcji VI.A.4.
- (⁵) Test IF został opisany w sekcji VI.A.5.
- (⁶) Test PCR został opisany w sekcji VI.A.6.
- (⁷) Test FISH został opisany w sekcji VI.A.7.
- (⁸) Test ELISA został opisany w sekcji VI.A.8.
- (⁹) Test biologiczny został opisany w sekcji VI.A.9.
- (¹⁰) Kolonia o typowej morfologii została opisana w sekcji II.3.d.
- (¹¹) Hodowla lub test biologiczny mogą się nie powieść z powodu konkurencji lub inhibicji przez bakterie saprofityczne. Jeśli w badaniach przesiewowych uzyska się pozytywne wyniki, lecz badania izolacji są negatywne, należy powtórzyć badania izolacji.
- (¹²) Wiarygodną identyfikację czystej kultury *Ralstonia solanacearum* otrzymuje się przy zastosowaniu badań wyszczególnionych w sekcji VI.B.
- (¹³) Test patogeniczności został opisany w sekcji VI.C.

SEKCJA II

SZCZEGÓŁOWE METODY WYKRYWANIA RALSTONIA SOLANACEARUM W BULWACH ZIEMNIAKA I ROŚLINACH ZIEMNIAKA, POMIDORA LUB INNYCH ROŚLINACH ŻYWICIELSKICH Z OBJAWAMI ŚLUZAKA LUB WIĘDNIĘCIA BAKTERYJNEGO**1. Objawy** (patrz: strona internetowa <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>)**1.1. Objawy na ziemniaku**

Roślina ziemniaka. Wczesnym stadium infekcji w polu jest więdnienie liści od podstawy w kierunku wierzchołka rośliny w wysokiej temperaturze panującej w ciągu dnia oraz poprawa ich stanu w ciągu nocy. We wczesnych stadiach więdnienia liście pozostają zielone, lecz później żółkną i rozwijają się nekrozy. Występuje również epinastia. W szybkim czasie więdnienie jednego pędu lub całej rośliny staje się nieodwracalne i prowadzi do śmierci całej rośliny. Tkanka naczyniowa w łodygach przeciętych w poprzek więdnącej rośliny zwykle brązowieje, a z przeciętej powierzchni wypływa mleczny śluz bakteryjny lub można go wycisnąć z rośliny. Gdy uciętą łodygę wstawi się pionowo do wody, z wiązek naczyniowych będzie wypływać śluz.

Bulwa ziemniaka. Bulwy ziemniaka należy przecinać poprzecznie w pobliżu części przystolonowej lub podłużnie poprzez stolon. Wczesne stadium infekcji objawia się odbarwieniem szklistożółtym do lekko brązowego pierścienia naczyniowego, na którym po kilku minutach samoistnie zacznie pojawiać się kremowy wyciek. Później przebarwienie wiązek naczyniowych staje się bardziej brązowe, a nekrozy mogą objąć tkankę parenchymatyczną. W zaawansowanych stadiach choroby infekcja rozprzestrzenia się i obejmuje nie tylko części przystolonowej oraz oczka, z których mogą wypływać bakterie, co powoduje przyleganie cząstek glebowych. Mogą pojawić się czerwono-brązowe, lekko zapadnięte zmiany na naskórku z powodu wewnętrznego zapadania się tkanek naczyniowych. W zaawansowanych stadiach choroby częste jest występowanie wtórnego rozwoju zgnilizny grzybowej i bakteryjnej.

1.2. Objawy na pomidorze

Roślina pomidora. Pierwszym widocznym objawem jest zwiędły wygląd najmłodszych liści. W korzystnych dla patogenu warunkach środowiska (temperatura gleby około 25 °C, wysoka wilgotność powietrza) w ciągu kilku dni następuje epinastia oraz więdnienie jednej strony lub całej rośliny, co prowadzi do pokładania się rośliny. W warunkach mniej korzystnych (temperatura gleby niższa od 21 °C) więdnienie jest mniejsze, lecz na łodydze może rozwinąć się wiele nowych korzeni. Można zaobserwować tłustawy pasek dookoła łodygi, który świadczy o martwicy układu naczyniowego. Po przecięciu łodygi w poprzek odbarwione brązowe tkanki naczyniowe wydzielają krople białego lub żółtawego śluzu bakteryjnego.

1.3. Objawy na innych roślinach żywicielskich

Rośliny Solanum dulcamara oraz S. nigrum. W warunkach naturalnych objawy więdnienia u tych żywicieli obserwuje się rzadko, chyba że temperatura gleby przekracza 25 °C lub poziomy inokulum są bardzo wysokie (np. jak dla *S. nigrum* rosnącej w pobliżu chorej rośliny ziemniaka lub pomidora). Gdy nie występuje więdnienie, objawy są takie jak w przypadku pomidora. Rośliny *S. dulcamara*, które nie więdną, rosnące z łodygami i korzeniami w wodzie, mogą wykazywać wewnętrzne lekkie brązowawe przebarwienie wiązek przewodzących na przekroju poprzecznym podstawy łodygi lub na częściach znajdujących się pod wodą. Z przeciętych wiązek przewodzących mogą wydostawać się bakterie lub smugi śluzu, jeśli przecięta łodyga zostanie ustawiona pionowo w wodzie, nawet przy braku objawów więdnienia.

2. Szybkie testy przesiewowe

Szybkie testy przesiewowe mogą ułatwić wstępną diagnozę, ale nie są niezbędne. Należy zastosować jeden lub kilka z poniższych zatwierdzonych testów:

2.1. Badanie na obecność wycieków z wiązek przewodzących łodygi

(Patrz: sekcja VI.A.1)

2.2. Wykrywanie granulek poli- β -hydroksymaślanu (PHB)

Charakterystyczne granulki PHB w komórkach *R. solanacearum* można zobaczyć, wybarwiając je na szkiełku przedmiotowym błękitem Nilu A lub czernią sudanową w utrwalonych termicznie rozmazach śluzu bakteryjnego z porażonej tkanki (patrz: sekcja VI.A.2).

2.3. Test aglutynacji serologicznej

(Patrz: sekcja VI.A.3.)

2.4. Inne testy

Dalsze odpowiednie badania przesiewowe to test IF (patrz: sekcja VI.A.5), Test FISH (patrz: sekcja VI.A.7), testy ELISA (patrz: sekcja VI.A.8) oraz test PCR (patrz: sekcja VI.A.6).

3. Posiew na podłoża selektywne

- a) Pobrać wyciek z tkanki lub fragmenty przebarwionej tkanki z pierścienia wiązek przewodzących bulwy ziemniaka albo z wiązek łodygi rośliny ziemniaka, pomidora lub innych wędnących roślin żywicielskich. Zawiesić je w niewielkiej ilości sterylnej wody destylowanej lub 50 mM buforu fosforanowego (dodatek 4) i pozostawić na 5–10 minut.
- b) Przygotować serię dziesięciokrotnych rozcieńczeń zawiesiny.
- c) Przenieść 50–100 µl zawiesiny i jej rozcieńczeń na pożywkę uniwersalną (NA, YPGA lub SPA; patrz: dodatek 2) i/lub na pożywkę tetrazolową Kelmana (dodatek 2) i/lub na zatwierdzoną selektywną pożywkę (np. SMSA; patrz: dodatek 2). Nanieść i rozprowadzić zawiesinę na płytce. W razie potrzeby przygotować oddzielne płytki z rozcieńczoną zawiesiną *R. solanacearum* biowaru 2 jako kontrolę pozytywną.
- d) Inkubować płytki przez 2–6 dni w temperaturze 28 °C.
 - Na pożywkach uniwersalnych wirulentne szczepy *R. solanacearum* rosną w postaci kolonii perlowo-białych, płaskich, nieregularnych i ciekłych, często z charakterystycznymi spiralami w środku. Awirulentne postacie *R. solanacearum* rosną jako małe, okrągłe, nieciekle kolonie całkowicie kremowo-białe.
 - Na pożywce tetrazolowej Kelmana i SMSA spirale mają krwistoczerwony kolor. Awirulentne postacie *R. solanacearum* rosną jako małe, okrągłe, nieciekle kolonie całe o głęboko czerwonej barwie oraz o maślanej konsystencji.

4. Testy identyfikacyjne dla *R. solanacearum*

Badania potwierdzające wstępną identyfikację szczepów *R. solanacearum* pokazano w sekcji VI.B.

SEKCJA III

1. Szczegółowe metody wykrywania i identyfikacji *R. solanacearum* w próbach bezobjawowych bulw ziemniaka

1.1. Przygotowanie próby

Uwaga:

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

Fakultatywne czynności wstępne przed przygotowaniem próby:

- a) Inkubować próby w temperaturze 25–30 °C przez okres do dwu tygodni przed badaniem, aby pomóc w namnożeniu populacji *R. solanacearum*.
- b) Umyć bulwy. Użyć właściwych środków odkażających (związki chloru, gdy zastosowane ma być badanie PCR dla usunięcia DNA patogenu) i detergentów pomiędzy każdą próbą. Wysuszyć bulwy na powietrzu. Ta procedura mycia jest szczególnie przydatna (lecz niewymagana) przy próbach z nadmiarem ziemi i w przypadku wykonywania testu PCR lub procedury bezpośredniej izolacji.

- 1.1.1. Usunąć czystym i zdezynfekowanym skalpelem lub nożem do warzyw skórkę z części przystolonowej każdej bulwy, w taki sposób, by odsłonić tkanki przewodzące. Starannie wyciąć mały stożek z tkanki przewodzącej z części przystolonowej i ograniczyć ilość tkanki innej niż przewodząca do minimum. (Patrz: strona internetowa <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Uwaga: Odłożyć na bok wszystkie (gnijące) bulwy z objawami śluzaka przechowywać i badać oddzielnie.

Jeżeli w czasie pobierania tkanki przystolonowej obserwuje się objawy nasuwające podejrzenie śluzaka, należy przeprowadzić wzrokowe badanie bulwy i przeciąć bulwę w części przystolonowej. Wszystkie przekroje bulw z podejrzanymi objawami powinny być pozostawione co najmniej przez dwie doby w temperaturze pokojowej, aby umożliwić korkowacenie i przechowywane w lodówce (w temperaturze 4–10 °C) we właściwych warunkach kwarantanny. Wszystkie bulwy, włącznie z tymi przejawiającymi podejrzenie objawy, należy przechowywać zgodnie z załącznikiem III.

- 1.1.2. Fragmenty części przystolonowych umieścić w nieużywanych wcześniej pojemnikach jednorazowego użytku, które można szczelnie zamknąć (w przypadku powtórnego użycia pojemników należy je starannie oczyścić i zdezynfekować przy użyciu związków chloru). Pobrane fragmenty części przystolonowych najlepiej poddać obróbce niezwłocznie. Jeżeli jednak nie będzie to możliwe, przechować je w pojemniku bez dodatku buforowego w lodówce nie dłużej niż 72 godziny lub nie dłużej niż 24 godziny w temperaturze pokojowej.

Z pobranymi fragmentami części przystolonowych postępować według jednej z następujących procedur:

- a) fragmenty tkanki przystolonowej pokryć dostateczną objętością (około 40 ml) buforu do ekstrakcji (dodatek 4) i mieszać na wyrząsarce obrotowej (50–100 obr./min) przez 4 godziny, utrzymując temperaturę poniżej 24 °C lub przez 16–24 godzin w lodówce;

lub

- b) fragmenty tkanki przystolonowej homogenizować z odpowiednią ilością (około 40 ml) buforu do ekstrakcji (dodatek 4) albo z użyciem miksera (np. Waring lub Ultra Thurax), albo przez rozdrabnianie w szczelnie zamkniętej jednorazowej torebce do maceracji (np. Stomacher lub Bioreba z polietylenu o dużej wytrzymałości, 150 x 250 mm; sterylizowane promieniowaniem), używając gumowego młotka lub odpowiedniego aparatu do rozdrabniania (np. Homex).

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

- 1.1.3. Zdekantować supernatant. Jeśli jest zbyt mętny, sklarować – albo przez odwirowanie przy niskiej liczbie obrotów (przy nie więcej niż 180 g przez 10 minut w temperaturze 4–10 °C) lub przez filtrację w próżni (40–100 µm), myjąc filtr dodatkowym (10 ml) buforem do ekstrakcji.

- 1.1.4. Zagęścić frakcję bakterii przez odwirowanie przy 7 000 g przez 15 minut (lub 10 000 g przez 10 minut) w temperaturze 4–10 °C i odrzucić supernatant bez naruszania osadu

- 1.1.5. Zawiesić powtórnie osad w 1,5 ml buforu do zawieszania osadu (dodatek 4). Stosować 500 µl do badań na obecność *R. solanacearum*, 500 µl na obecność *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* i 500 µl do celów porównawczych. Dodać sterylną glicerynę aż do uzyskania ostatecznego stężenia 10–25 % (obj./obj.) i dodać do 500 µl zawiesiny porównawczej i do pozostałej zawiesiny testowej, zworteksować i przechowywać w temperaturze od –16 do –24 °C (tygodnie) lub od –68 do –86 °C (miesiące). W czasie wykonywania testu przechowywać zawiesiny testowe w temperaturze 4–10 °C.

Wielokrotne zamrażanie i rozmrażanie nie jest wskazane.

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

- 1.1.6. Jest niezwykle ważne, aby w celu uniknięcia kontaminacji wszystkie kontrole pozytywne *R. solanacearum* i próby badać osobno. Odnosi się to zarówno do szkiełek IF, jak i do wszystkich testów.

1.2. Badanie

Patrz: schemat blokowy i opis testów i protokołów zoptymalizowanych znajdujące się w odpowiednich dodatkach:

Posiew na podłoża selektywne (patrz: sekcja VI.A.4)

Test IF (patrz: sekcja VI.A.5)

Test PCR (patrz: sekcja VI.A.6)

Test FISH (patrz: sekcja VI.A.7)

Testy ELISA (patrz: sekcja VI.A.8)

Test biologiczny (patrz: sekcja VI.A.9)

2. Szczegółowe metody wykrywania i identyfikacji *R. solanacearum* w próbach bezobjawowych roślin ziemniaka, pomidora lub innych roślin żywicielskich

2.1. Przygotowanie próby

Uwaga: Przy wykrywaniu utajonych populacji *R. solanacearum* zaleca się przebadanie prób złożonych. Procedurę tę można łatwo zastosować do prób złożonych o wielkości do 200 części lodygi. Przy wykonywaniu badań powinny się one opierać o statystycznie reprezentatywną próbę badanej populacji rośliny.

2.1.1. Pobrać fragmenty lodygi o wielkości 1–2 cm do zamkniętego sterylnej pojemnika zgodnie z poniższą procedurą próbobrania:

Sadzonki pomidora w szkółce: Przy pomocy czystego zdezynfekowanego noża pobrać 1 cm fragment u podstawy każdej lodygi, tuż nad glebą.

Rośliny pomidora hodowane na polu lub w szklarni: Przy pomocy czystego zdezynfekowanego noża pobrać najniższy pęd boczny z każdej rośliny, ucinając go tuż nad połączeniem z lodygą główną. Z każdego pędu bocznego odciąć najniższy 1 cm fragment.

Inni żywiele: Przy pomocy czystego zdezynfekowanego noża lub sekatora pobrać 1 cm fragment u podstawy każdej lodygi, tuż nad glebą. W przypadku *S. dulcamara* lub innych roślin żywicielskich rosnących w wodzie, pobrać 1–2 cm fragmenty z lodygi znajdującej się pod wodą lub rozłogi z korzeniami wodnymi.

Podczas próbobrania w danym miejscu zaleca się przebadanie statystycznie reprezentatywnej próby składającej się z przynajmniej 10 roślin z miejsca próbobrania każdego potencjalnego żywiciela. Wykrycie patogenu będzie najbardziej wiarygodne późną wiosną, latem i jesienią, choć u wieloletnich *Solanum dulcamara* rosnących w ciekach wodnych porażenie naturalne można wykrywać przez cały rok. Znani żywiele to samosiewy ziemniaka (ground-keeper), *Solanum dulcamara*, *S. nigrum*, *Datura stramonium* i inni członkowie rodziny *Solanaceae*. Inni żywiele to *Pelargonium* spp. oraz *Portulaca oleracea*. Niektóre gatunki chwastów europejskich, których korzenie lub ich rizosfera w pewnych szczególnych warunkach środowiskowych mogą potencjalnie stanowić rezerwuuar populacji *R. solanacearum* biowar 2/rasa 3, to: *Atriplex hastata*, *Bidens pilosa*, *Cerastium glomeratum*, *Chenopodium album*, *Eupatorium cannabinum*, *Galinsoga parviflora*, *Ranunculus scleratus*, *Rorippa* spp., *Rumex* spp., *Silene alba*, *S. nutans*, *Tussilago farfara* oraz *Urtica dioica*.

Uwaga: Na tym etapie można zastosować wizualne badanie na obecność wewnętrznych objawów (przebarwienie wiązek naczyniowych lub wyciek śluzu bakteryjnego). Odłożyć na bok wszystkie fragmenty lodygi wykazujące objawy i przebadać je oddzielnie (patrz: sekcja II).

2.1.2. Zdezynfekować fragmenty lodygi krótko przy pomocy 70 % alkoholu etylowego i natychmiast wytrzeć je do sucha przy pomocy bibuły. Po czym poddać fragmenty lodyg jednej z następujących procedur:

a) fragmenty pokryć dostateczną objętością (około 40 ml) buforu do ekstrakcji (dodatek 4) i mieszać na wytrząsarce obrotowej (50–100 obr./min) przez 4 godziny, utrzymując temperaturę poniżej 24 °C lub przez 16–24 godzin w lodówce; lub

b) rozpocząć procedurę bezzwłocznie, miazdząc odcinki w mocnej torebce do maceracji (np. Stomacher lub Bioreba) z odpowiednią ilością buforu ekstrakcyjnego (dodatek 4), używając gumowego młotka lub odpowiedniego urządzenia do rozdrabniania (np. Homex). Jeśli nie jest to możliwe, przechowywać odcinki lodyg nie dłużej niż 72 godziny w lodówce lub nie dłużej niż 24 godziny w temperaturze pokojowej.

2.1.3. Zdekantować supernatant po ustaleniu się przez 15 minut.

2.1.4. Dalsze klaryfikowanie ekstraktu lub zagęszczanie frakcji bakteryjnej zwykle nie jest wymagane, ale można je osiągnąć przez filtrację i/lub odwirowanie, jak opisano w częściach III.1.1.3–1.1.5.

2.1.5. Podzielić czysty lub stężony ekstrakt z próby na dwie równe części. W czasie przeprowadzania testu jedną połowę trzymać w temperaturze 4–10 °C, a drugą połowę – z 10–25 % (obj./obj.) – sterylnego glicerolu przechowywać w temperaturze – 16 do – 24 °C (tygodnie) lub – 68 do – 86 °C (miesiące), jeśli wymagane są dalsze testy.

2.2. Badanie

Patrz: schemat blokowy i opis testów i protokołów zoptymalizowanych znajdujące się w odpowiednich dodatkach:

Posiew na podłoża selektywne (patrz: sekcja VI.A.4)

Test IF (patrz: sekcja VI.A.5)

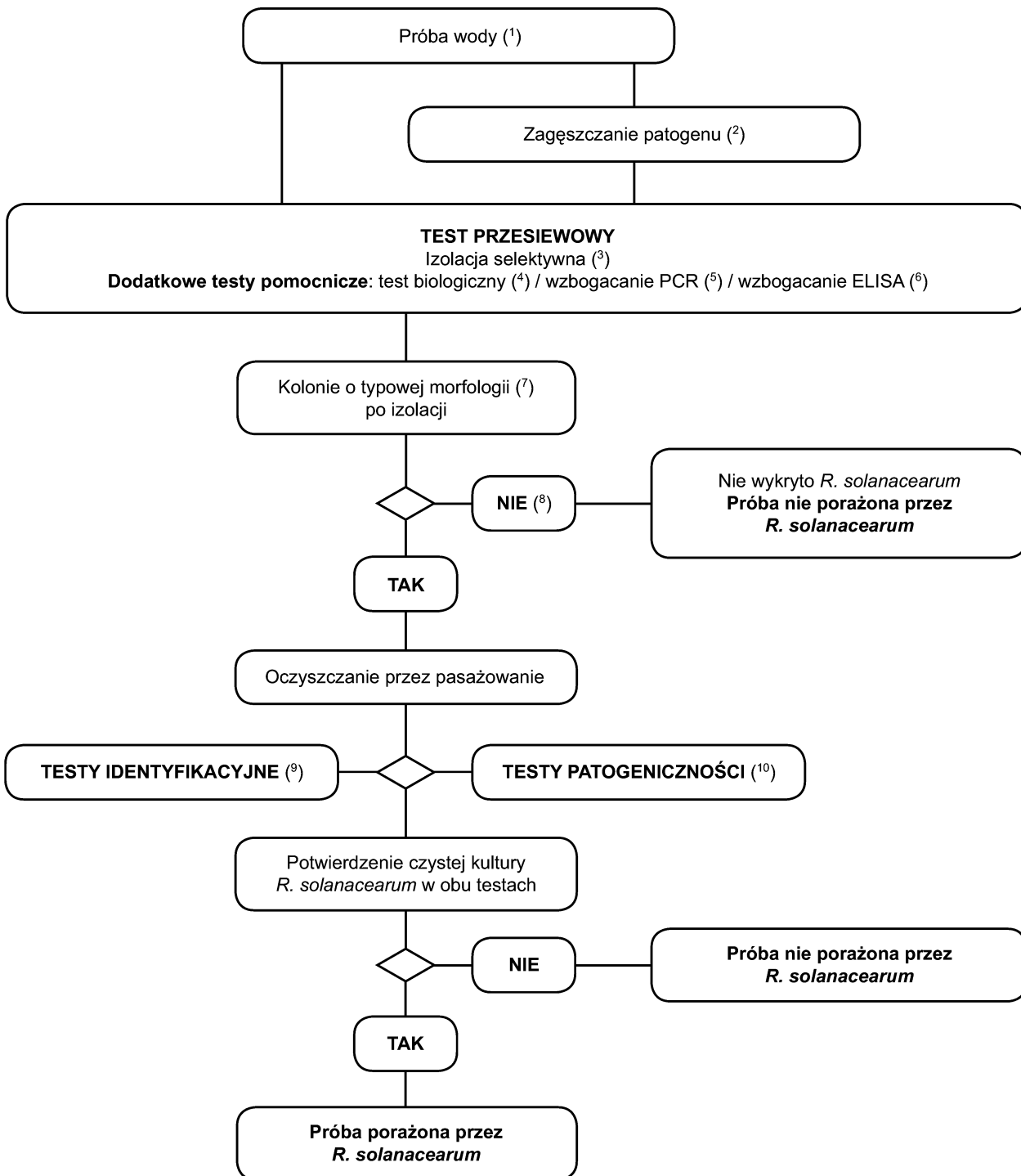
Test PCR (patrz: sekcja VI.A.6)

Test FISH (patrz: sekcja VI.A.7)

Testy ELISA (patrz: sekcja VI.A.8)

Test biologiczny (patrz: sekcja VI.A.9)

SEKCJA IV

1. Schemat wykrywania i identyfikacji *R. solanacearum* w wodzie

- (¹) Zalecane procedury wykonywania prób, patrz: sekcja IV.2.1.
- (²) Metody zagęszczania patogenu zostały opisane w sekcji IV.2.1. Koncentracja zwiększa populacje patogenu i konkurujących bakterii saprofitycznych i jest zalecana tylko wówczas, gdy nie powoduje inhibicji izolacji.
- (³) Izolacja na podłoża selektywne została opisana w sekcji VI.A.4.
- (⁴) Test biologiczny opisano w sekcji VI.A.9.
- (⁵) Metody wzbogacania PCR zostały opisane w sekcji VI.A.4.2 i sekcji VI.A.6.
- (⁶) Metody wzbogacania ELISA zostały opisane w sekcji VI.A.4.2 i sekcji VI.A.8.
- (⁷) Kolonia o typowej morfologii została opisana w sekcji II.3.d.
- (⁸) Hodowla kultury może nie powieść z powodu konkurencji lub inhibicji ze strony bakterii saprofitycznych. Jeśli podejrzewa się, że duże populacje saprofityczne wpłyną na skuteczność izolacji, wówczas należy powtórzyć badania izolacji po rozcieńczeniu próby w sterylnej wodzie.
- (⁹) Wiarygodną identyfikację czystej kultury *Ralstonia solanacearum* otrzymuje się przy zastosowaniu badań wyszczególnionych w sekcji VI.B.
- (¹⁰) Test patogeniczności został opisany w sekcji VI.C.

2. Metody wykrywania i identyfikacji *R. solanacearum* w wodzie

Zasada

Zatwierdzony schemat wykrywania opisany w tej sekcji dotyczy wykrywania patogenu w próbach wód powierzchniowych i można go zastosować do badania prób ścieków z obróbki ziemniaków lub ścieków ciepłych. Ważne jest jednak, aby pamiętać, że oczekiwana czułość wykrywania zmienia się w zależności od substratu. Na czułość badania izolacji wpływ mają populacje konkurujących bakterii saprofitycznych, które są na ogół o wiele większe przy przetwarzaniu ziemniaków i w ściekach niż w wodzie powierzchniowej. Zakłada się, że poniższy schemat wykryje zaledwie 10^3 komórek na litr w wodzie powierzchniowej, natomiast czułość wykrywania przy przetwarzaniu ziemniaków lub w ściekach będzie prawdopodobnie znacznie niższa. Z tego powodu zaleca się badać ścieki po ich utylizacji (np. sedimentacji lub przefiltrowaniu), w czasie których to operacji zmniejszają się populacje saprofityczne. Ograniczenia czułości schematu badania powinno się wziąć pod uwagę przy ocenie wiarygodności wszelkich uzyskanych wyników negatywnych. Schemat ten był z powodzeniem stosowany w pracach badawczych dla ustalenia występowania lub braku patogenu w wodzie powierzchniowej, jednak należy pamiętać o jego ograniczeniach przy używaniu go do podobnych badań ścieków pochodzących z obróbki ziemniaków lub ścieków ciepłych.

2.1. Przygotowanie próby

Uwaga:

- Wykrycie *R. solanacearum* w wodzie powierzchniowej jest najbardziej pewne późną wiosną, latem i jesienią, gdy temperatura wody przekracza 15 °C.
- Wielokrotne próbobranie w różnych okresach w powyższym terminie w wyznaczonych punktach zwiększa prawdopodobieństwo wykrycia dzięki zmniejszeniu skutków zmian klimatycznych.
- Pod uwagę należy wziąć skutki ulewnych deszczów i lokalizację cieków wodnych dla uniknięcia skutków nadmiernego rozwodnienia, co może wpływać na zamaskowanie obecności patogenu.
- Próby wody należy pobrać w sąsiedztwie roślin żywicielskich, jeśli takie występują.

2.1.1. W wybranych punktach próbobrania pobrać próby wody, wypełniając nią jednorazowe sterylne probówki lub butelki na głębokości, o ile to możliwe, poniżej 30 cm i w promieniu 2 m od brzegu. W przypadku ścieków pochodzących z obróbki ziemniaków lub ścieków ciepłych, próby należy pobrać z punktu usuwania ścieków. Zaleca się stosowanie prób o wielkości do 500 ml na punkt próbobrania. Jeśli preferowane są próby mniejsze, zaleca się pobieranie prób przynajmniej 3 razy z każdego punktu próbobrania, z czego każda próba składa się z 2 podprób, każda o objętości minimum 30 ml. Przy intensywnych badaniach należy wybrać przynajmniej 3 punkty próbobrania na odcinku cieków wodnego o długości 3 km i zagwarantować, że zostaną pobrane próby również z dopływów.

2.1.2. Próby transportować w niskiej temperaturze (4–10 °C), bez dostępu światła i przebadać w ciągu 24 godzin.

2.1.3. W miarę potrzeby przy pomocy jednej z poniższych metod można zagęścić frakcję bakteryjną:

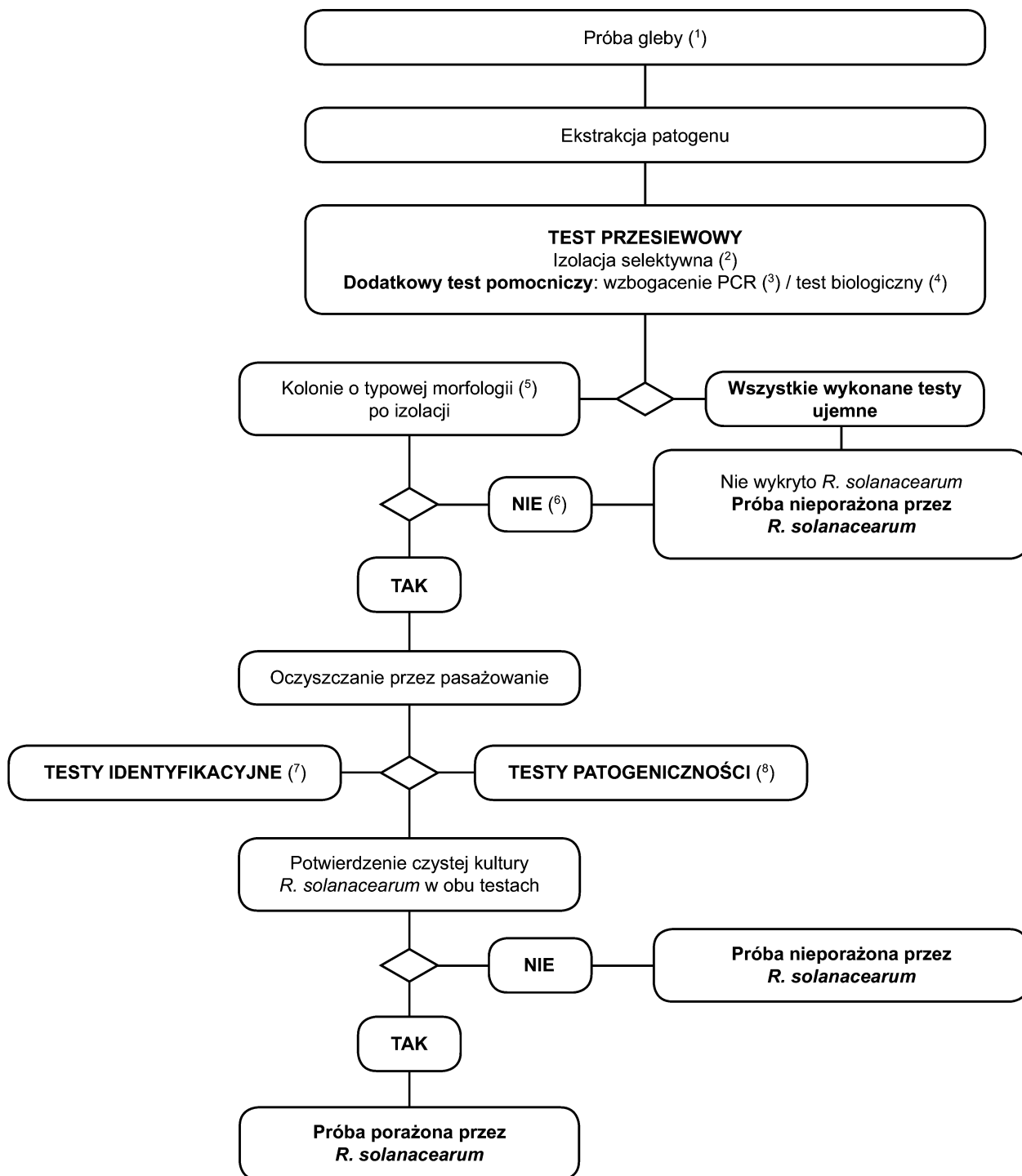
- a) wirować 30–50 ml podpróby w 10 000 g przez 10 minut (lub 7 000 g przez 15 minut), najlepiej w temperaturze 4–10 °C, usunąć zawiesinę i ponownie zawiesić osad w 1 ml buforu do zawieszania osadu (dodatek 4);
- b) przeprowadzić filtrację membranową (minimalny rozmiar porów 0,45 µm), po której przemyć filtr 5–10 ml buforu do zwieszania osadu i zebrać popłuczyny. Metoda ta ma zastosowanie do większych objętości wody zawierającej małą ilość saprofitów.

Zagęszczania nie poleca się zazwyczaj dla prób ścieków pochodzących z obróbki ziemniaków lub ścieków ciepłych, ponieważ zwiększona populacja konkurujących bakterii saprofitycznych hamuje wykrywanie *Ralstonia solanacearum*.

2.2. Badanie

Patrz: schemat blokowy i opis badań we właściwych protokołach.

SEKCJA V

1. Schemat wykrywania i identyfikacji *R. solanacearum* w glebie

- (¹) Zalecane procedury próbobrania, patrz: sekcja V.2.1.
- (²) Izolacja na podłoża selektywne została opisana w sekcji VI.A.4.
- (³) Metody wzbogacania PCR zostały opisane w sekcji VI.A.4.2 i sekcji VI.A.6.
- (⁴) Test biologiczny został opisany w sekcji VI.A.9.
- (⁵) Kolonia o typowej morfologii została opisana w sekcji II.3.d.
- (⁶) Hodowla kultury może nie powieść z powodu konkurencji lub inhibicji ze strony bakterii saprofitycznych. Jeśli podejrzewa się, że duże populacje saprofityczne wpłyną na skuteczność izolacji, wówczas należy powtórzyć badania izolacji po rozcieńczeniu próby.
- (⁷) Wiarygodną identyfikację czystej kultury *Ralstonia solanacearum* otrzymuje się przy zastosowaniu badań wyszczególnionych w sekcji VI.B.
- (⁸) Test patogeniczności został opisany w sekcji VI.C.

2. Metody wykrywania i identyfikacji *R. solanacearum* w glebie

Zasada

Zatwierdzony schemat wykrywania opisany w tej sekcji dotyczy wykrywania patogenu w próbach gleby, lecz można go również wykorzystać do badania prób stałego lub ciekłego odpadu z obróbki ziemniaka. Ważne jest jednak, aby pamiętać, że metody te nie są wystarczająco czułe do zagwarantowania wykrywania nisko i/lub nieregularnie rozproszonych populacji *Ralstonia solanacearum*, które mogą występować w naturalnie porażonych próbach tych substratów.

Przy ocenie wiarygodności wszelkich uzyskanych wyników negatywnych, jak również przy badaniu w celu określenia obecności lub nieobecności patogenu w glebie i odpadach powinno się wziąć pod uwagę ograniczenia czułości schematu badania. Najbardziej wiarygodnym badaniem obecności patogenu w glebie jest posadzenie żywiciela podatnego na chorobę i kontrolowanie go pod względem porażenia, lecz nawet przy tej metodzie niskie poziomy porażenia nie zostaną wykryte.

2.1. Przygotowanie próby

2.1.1. Próbobranie gleby z pola powinno być wykonane zgodnie ze standardowymi zasadami stosowanymi dla prób nicieniovych. Należy pobrać 0,5–1 kg ziemi dla każdej próby z 60 miejsc na każde 0,3 ha z głębokości 10–20 cm (lub w siatce 7 x 7 metrów). Jeśli istnieje podejrzenie występowania patogenu, należy zwiększyć liczbę punktów poboru do 120 na 0,3 ha. Przed badaniem próby trzymać w temperaturze 12–15 °C. Próby osadów z obróbki ziemniaków i ścięków należy sporządzić, pobierając łącznie 1 kg z punktów próbobrania, tak aby były reprezentatywne dla całkowitej wielkości badanego osadu. Przed badaniem dobrze wymieszać każdą próbę.

2.1.2. Podpróby 10–25 g ziemi lub osadu zawiesić w 60–150 ml buforu ekstrakcyjnego (dodatek 4) i wytrząsać na wstrząsarce obrotowej (250 obr./min) przez okres do 2 godzin. W razie potrzeby w rozdrobnieniu może pomóc dodanie 0,02 % sterylnej Tween-20 i 10–20 g sterylnej żwiru.

2.1.3. W czasie badania utrzymywać zawiesinę w temperaturze 4 °C.

2.2. Badanie

Patrz: schemat blokowy i opis badań we właściwych protokołach.

SEKCJA VI

ZOPTYMALIZOWANE PROTOKOŁY WYKRYWANIA I IDENTYFIKACJI *R. SOLANACEARUM*

A. TESTY DIAGNOSTYCZNE I WYKRYWANIE

1. Badanie na obecność wycieków z wiązek przewodzących łądygi

Obecność *R. solanacearum* w więdnących łądygach ziemniaka lub pomidora lub innych roślin żywicielskich można stwierdzić, wykonując poniższe proste badanie wstępne: uciąć łądygę tuż nad poziomem gleby. Umieścić odciętą powierzchnię łądygi w probówce napełnionej czystą wodą. Po kilku minutach można zaobserwować charakterystyczny samoczynny wpływ śluzu bakteryjnego z przeciętych wiązek przewodzących.

2. Badanie na obecność granulek poly- β -hydroksymaślanu

1. Przygotować rozmaz śluzu bakteryjnego z porażonej tkanki albo rozmaz z 48-godzinnej hodowli na pożywce YPGA lub SPA (dodatek 2) na szkiełku mikroskopowym.
2. Przygotować rozmazy kontroli pozytywnej ze szczepu biowar 2 *R. solanacearum*, oraz jeśli konieczne, przygotować rozmaz kontroli negatywnej PHB sp.
3. Pozostawić rozmazy do wyschnięcia i przesunąć dolną część szkiełka kilkakrotnie w płomieniu palnika, w celu utrwalenia rozmazu.
4. Preparat wybarwić błękitem nilu lub czernią sudanową i obserwować pod mikroskopem zgodnie z poniższym opisem.

Badanie z błękitem Nilu:

- a) Zanurzyć utrwalony rozmaz w 1 % wodnym roztworze błękitu nilu A i inkubować przez 10 minut w temperaturze 55 °C.
- b) Zlać roztwór barwiący. Oplukać krótko pod kranem z bieżącą wodą. Usunąć nadmiar wody bibułą.
- c) Zanurzyć rozmaz w 8 % wodnym roztworze kwasu octowego i inkubować przez 1 minutę w temperaturze otoczenia.
- d) Oplukać krótko pod kranem z bieżącą wodą. Usunąć nadmiar wody bibułą.
- e) Ponownie zwilżyć rozmaz kroplą wody i nałożyć szkiełko przykrywkowe.
- f) Oglądać rozmaz pod mikroskopem epifluorescencyjnym w świetle 450 nm, pod warstwą oleju immersyjnego, przy powiększeniu 600–1 000 razy, używając do tego celu obiektywu olejowego lub wodnego.
- g) Sprawdzić, czy pojawi się jasna, pomarańczowa fluorescencja granulek PHB. Sprawdzić także w świetle normalnym, czy wewnątrz komórek znajdują się granulki i czy morfologia komórek ma cechy typowe dla *R. solanacearum*.

Badanie z czernią sudanową:

- a) Zanurzyć utrwalony rozmaz w 0,3 % roztworze czerni sudanowej B w 70 % alkoholu etylowym i inkubować przez 10 minut w temperaturze otoczenia.
- b) Zlać roztwór barwiący i krótko płukać pod bieżącą wodą z kranu, usuwając nadmiar wody bibułą.
- c) Zanurzyć szkiełka na chwilę w ksylenie i osuszyć na bibule. *Uwaga: Ksylen jest substancją szkodliwą dla zdrowia, dlatego należy przedsięwziąć odpowiednie środki bezpieczeństwa i pracować w dygestorium.*
- d) Zanurzyć szkiełka w 0,5 % (w/v) wodnym roztworze safraniny i pozostawić na 10 sekund w temperaturze otoczenia. *Uwaga: Safranina jest substancją szkodliwą dla zdrowia, dlatego należy przedsięwziąć odpowiednie środki bezpieczeństwa i pracować w dygestorium.*
- e) Wyplukać delikatnie wodą z kranu, osuszyć na bibule i nałożyć szkiełko przykrywkowe.
- f) Oglądać wybarwiony rozmaz pod mikroskopem, stosując światło przechodzące, pod warstwą olejku immersyjnego, przy powiększeniu 1 000 razy z użyciem obiektywu olejowego.
- g) Granulki PHB w komórkach *R. solanacearum* wybarwiają się na kolor czarno-niebieski, a ściany komórkowe na różowo.

3. Test aglutynacji serologicznej

Aglutynacja komórek *R. solanacearum* w śluzie bakteryjnym lub ekstrakcie z tkanek symptomatycznych jest najlepiej widoczna przy użyciu zatwierdzonych przeciwciał (patrz: dodatek 3) oznaczonych odpowiednio zabarwionymi markerami, takimi jak czerwone komórki *Staphylococcus aureus* lub zabarwione elementy lateksowe. Używając zestawu dostępnego w obrocie handlowym (patrz: dodatek 3), należy postępować zgodnie ze wskazówkami producenta. W przeciwnym razie należy wykonać następującą procedurę:

- a) Wymieszać krople zawiesiny przeciwciał i śluzu bakteryjnego (ok. 5 µl każdej) na okienkach szkiełek z wieloma zagłębieniami.
- b) Przygotować kontrolę pozytywną i negatywną przy użyciu zawiesin *R. solanacearum* biowar 2 i szczepu heterogenicznego.
- c) Mieszając delikatnie przez 15 sekund, można zaobserwować aglutynację w próbach pozytywnych.

4. Izolacja selektywna

4.1. Izolacja na podłoże selektywne

Uwaga: Przed użyciem tej metody po raz pierwszy, należy wykonać wstępne badania mające zagwarantować odtwarzalność wykrywania rzędu 10^3 do 10^4 jednostek *R. solanacearum* tworzących kolonie na ml dodany do ekstraktu prób, które uprzednio zostały przetestowane jako negatywne.

Należy użyć właściwie zatwierdzonej pożywki selektywnej, takiej jak SMSA (zmodyfikowanej przez Elphinstone *et al.*, 1996; patrz: dodatek 2).

Należy uważać, aby odróżnić *R. solanacearum* od innych bakterii będących w stanie rozwinąć kolonie na pożywce. Poza tym, kolonie *R. solanacearum* mogą wykazywać morfologię nietypową, jeśli płytki są przepelnione lub obecne są również bakterie antagonistyczne. Jeśli podejrzewa się występowanie skutków konkurencji lub antagonizmu, próby należy ponownie przebadać z użyciem innego testu.

Najwyższej czułości wykrywania przy użyciu tej metody można oczekiwać przy użyciu świeżo przygotowanych ekstraktów. Jednak metoda ta jest używana również w odniesieniu do ekstraktów przechowywanych w glicerynie w temperaturze -68 do -86 °C.

Jako kontrole pozytywne należy przygotować dziesięciokrotne rozcieńczenia zawiesiny 10^6 cfu na ml wirulentnego szczepu biowar 2 *R. solanacearum* (np. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857). Dla uniknięcia ewentualnej kontaminacji kontrole pozytywne należy przygotować w ścisłej separacji od badanych prób.

W przypadku każdej nowo przygotowanej partii pożywki selektywnej przed użyciem jej do przebadania rutynowych prób należy sprawdzić jej przydatność do wzrostu patogenu.

Kontrole pozytywne traktować w sposób identyczny, jak próbę(-y).

4.1.1. Zastosować odpowiednią technikę rozcieńczeń płytkowych w celu zapewnienia, że wszelkie saprofityczne populacje tworzące kolonie zostają rozcieńczone. Nanieść 50–100 μ l na płytkę ekstraktu i każdego rozcieńczenia.

4.1.2. Inkubować płytki w temperaturze 28 °C. Oglądanie płytek rozpocząć po 48 godzinach, a potem kontynuować codziennie do 6 dni. Typowe kolonie *R. solanacearum* na pożywce SMSA są mlecznobiałe, płaskie, nieregularne oraz ciekłe, a po 3 dniach inkubacji ich środek staje się od różowego do krwistoczerwonego z wewnętrznymi smugami lub spiralami. (Patrz: strona internetowa <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Uwaga: Na tej pożywce tworzą się czasami nietypowe kolonie *R. solanacearum*. Mogą być małe, okrągłe, całkiem czerwone i nieciekłe lub tylko częściowo ciekłe i w związku z tym mogą występować problemy z odróżnieniem ich od bakterii saprofitycznych tworzących kolonie.

4.1.3. W celu uzyskania pojedynczych kolonii oczyścić kolonie wstępne przez pasażowanie lub metodą rozcieńczeń płytkowych *R. solanacearum* na pożywce odżywczej (patrz: dodatek 2).

4.1.4. W celu krótkotrwałego przechowywania trzymać kultury w sterylnej wodzie (pH 6–8, bez chloru) w temperaturze pokojowej w ciemności lub w celu długotrwałego przechowywania w odpowiedniej pożywce kriochronnej lub w temperaturze -68 do -86 °C lub w postaci liofilizowanej.

4.1.5. Zidentyfikować czyste kultury (patrz: sekcja VI.B.) i wykonać test patogeniczności (patrz: sekcja VI. C).

Interpretacja wyników posiewu na podłoże selektywne

Wynik posiewu na podłoże selektywne jest negatywny w przypadku, gdy po 6 dniach nie obserwuje się żadnych kolonii bakteryjnych, albo jeżeli nie odnaleziono żadnych kolonii o morfologii charakterystycznej dla *R. solanacearum*, pod warunkiem że nie podejrzewa się inhibicji kolonii wskutek konkurencji lub antagonizmu przez inne bakterie i że na płytkach z kontrolą pozytywną potwierdzono obecność kolonii charakterystycznych dla *R. solanacearum*.

Wynik posiewu na podłoże selektywne jest pozytywny, jeżeli wyizolowano kolonie o morfologii charakterystycznej dla *R. solanacearum*.

4.2. Procedura wzbogacenia

Należy użyć zatwierdzonej pożywki wzbogacającej, takiej jak zmodyfikowana pożywka Wilbrink (patrz: dodatek 2).

Procedurę tę można wykorzystywać do selektywnego zwiększania populacji *R. solanacearum* w ekstraktach i zwiększenia czułości wykrywania. Procedura ta również skutecznie rozcieńcza inhibitory reakcji PCR (1:100). Należy jednak pamiętać, że wzbogacenie *R. solanacearum* może się nie udać wskutek konkurencji lub antagonizmu ze strony organizmów saprofitycznych, które często są równocześnie wzbogacane. Z tego powodu izolacja *R. solanacearum* ze wzbogaconych kultur pożywki może okazać się trudna. Poza tym, jako że można zwiększyć populację serologicznie zbliżonych saprofitów, zaleca się stosowanie konkretnych przeciwciał monoklinalnych raczej niż przeciwciał poliklinalnych, gdy stosowany ma być test ELISA.

- 4.2.1. Przy wzbogacaniu do testu PCR przenieść 100 µl ekstraktu do 10 ml pożywki wzbogaconej (dodatek 2) uprzednio umieszczonej w zlewkach lub kolbach pozbawionych DNA. Przy wzbogacaniu do testu ELISA można użyć większych proporcji ekstraktu do pożywki (np. 100 µl w 1,0 ml pożywki wzbogaconej).
- 4.2.2. Inkubować przez 72 godziny w temperaturze od 27 do 30 °C w hodowli wstrząsanej lub statycznej, a przykrywką powinna luźno przylegać do probówki, tak by umożliwić dostęp do powietrza.
- 4.2.3. Dobrze wymieszać przed użyciem w teście ELISA lub teście PCR.
- 4.2.4. Ze wzbogaconą pożywką postępować w taki sam sposób, jak z próbą w powyższych testach.

Uwaga: Jeśli przewiduje się zahamowanie procesu wzbogacenia *R. solanacearum* z powodu wysokich populacji niektórych konkurujących bakterii saprofitycznych, lepsze wyniki może dać wzbogacenie ekstraktów przed odwirowaniem lub innymi sposobami zagęszczania patogenu.

5. Test IF

Zasada

Stosowanie testu IF jako głównego testu przesiewowego jest zalecane z uwagi na wykazaną zdolność osiągnięcia wymaganych progów wykrywalności.

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

Uwaga: Należy używać zatwierzonego źródła przeciwciał przeciw *r. solanacearum* (patrz: strona internetowa <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Zaleca się, aby dla każdej nowej partii przeciwciał określać miano. Miano jest określane jako największe rozcieńczenie, przy którym zachodzi optymalna reakcja w czasie testowania zawiesiny od 10⁷ do 10⁶ komórek na ml homologicznego szczepu *R. solanacearum* i przy użyciu odpowiedniego koniugatu izotiocyanianu fluoresceiny (FITC), zgodnie z zaleceniami producenta. Stężone przeciwciała poliklonalne powinny mieć miano IF przynajmniej 1:2 000. W czasie przeprowadzania testu przeciwciała powinny być stosowane przy stężeniu roboczym (WD) bliskim lub równym mianu.

Test powinien być przeprowadzany na świeżo przygotowanych ekstraktach z prób. Jeśli to konieczne, może być z powodzeniem przeprowadzany na ekstraktach przechowywanych w temperaturze od – 68 do – 86 °C w glicerolu. Glicerol może być usunięty z próby przez dodanie 1 ml buforu do zawieszania osadu (dodatek 4), powtórne odwirowanie przez 15 minut przy 7 000 g i powtórne zawieszenie w równej objętości buforu do zawieszania osadu. Często nie jest to konieczne, zwłaszcza jeśli preparaty z prób były utrwalane na szkiełkach przy pomocy opalania.

Przygotować oddzielne szkiełka kontroli pozytywnej szczepu homologicznego lub innego szczepu odniesienia *R. solanacearum* zawieszzonego w ekstrakcie z ziemniaka, jak szczegółowo opisano w dodatku 3B, oraz ewentualnie w buforze.

W miarę możliwości na to samo szkiełko należy nanieść jako podobną kontrolę naturalnie zainfekowane tkanki (zachowane w formie liofilizowanej lub zamrożone w temperaturze od – 16 do – 24 °C).

Jako kontrolę negatywną na *R. solanacearum* stosować ekstrakty prób, które wcześniej dały w teście wynik ujemny.

Standaryzowane pozytywne i negatywne materiały kontrolne do wykorzystania w teście są wymienione w dodatku 3.

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

Kontrolę pozytywną traktować w sposób identyczny, jak próbę(-y).

5.1. Przygotować szkiełka do badań, stosując jedną z poniższych procedur:

- i) dla prób zawierających stosunkowo niewiele skrobi:

Odmierzyć pipetą standardową objętość (15 l odpowiada 6 mm średnicy okienka – dla większych okienek odmierzyć odpowiednio większą objętość) w rozcieńczeniu 1/100 zawieszzonego osadu ziemniaka na pierwsze okienko. Następnie odmierzyć pipetą podobną objętość nierozcieńczonego osadu (1/1) na pozostałe okienka w szeregu. Drugi szereg można wykorzystać do powtórzenia badania lub można go przeznaczyć do analizy drugiej próby, patrz: rysunek 1;

ii) dla innych osadów:

Przygotować dziesięciokrotne rozcieńczenia (1/10, 1/100) zawieszono osadu w buforze do zawieszania osadu. Odmierzyć standardową objętość (15 l odpowiada 6 mm średnicy okienka – dla większych okienek odmierzyć proporcjonalnie większą objętość) zawiesiny na szereg okienek. Drugi szereg można wykorzystać do powtórzenia badania lub można go przeznaczyć do analizy drugiej próby, patrz: rysunek 2.

5.2. Wysuszyć krople w temperaturze otoczenia lub ogrzewając je w temperaturze od 40 do 45 °C. Utrwalić komórki bakteryjne na szkiełku przez ogrzanie (15 minut w temp. 60 °C), albo umieszczenie w płomieniu, lub też za pomocą 95 % alkoholu etylowego zgodnie ze szczegółowymi instrukcjami dostawcy przeciwciał.

W miarę potrzeby utrwalone szkiełka można przechowywać zamrożone w suchym pojemniku przez jak najkrótszy okres (maksymalnie przez 3 miesiące) przed dalszym badaniem.

5.3. Procedura IF



i) Przygotować szkiełka tak jak opisano w ust. 5.1 ppkt i): Przygotować zestaw dwukrotnych rozcieńczeń.

Pierwsze okienko powinno mieć 1/2 miana (T/2), pozostałe 1/4 miana (T/4), 1/2 miana (T/2), miano (T) i dwukrotność miana (2T).


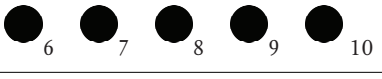
ii) Przygotować szkiełka do badania, jak opisano w ust. 5.1 ppkt ii):

Przygotować rozcieńczenie robocze (WD) przeciwciał w buforze IF. Rozcieńczenie robocze ma wpływ na specyficzność.

Rysunek 1 Przygotowanie szkiełka roboczego według 5.1 i) i 5.3 i)

		Rozcieńczenia próby ponownie zawieszono osadu w buforze					
		1/100	1/1	1/1	1/1	1/1	<input type="checkbox"/> Rozcieńczenie ponownie zawieszono osadu
(T = miano)		T/2	T/4	T/2	T	2T	<input type="checkbox"/> Dwukrotne rozcieńczenia surowicy/przeciwciała
Próba 1							
Powtórzenie próby 1 lub próba 2							

Rysunek 2 Przygotowanie szkiełka roboczego według ust. 5.1 ppkt ii) i 5.3 ppkt ii)

		Rozcieńczenie robocze surowicy/przeciwciała					
		1/1	1/10	1/100	puste	puste	<input type="checkbox"/> Dziesięciokrotne rozcieńczenia ponownie zawieszono osadu
Próba 1							
Powtórzenie próby 1 lub próba 2							

- 5.3.1. Ułożyć szkiełka na wilgotnej bibule. Pokryć całkowicie każde okienko rozcieńczonymi przeciwciałami. Objętość nakładanej surowicy musi być równa objętości nakładanego ekstraktu.

W przypadku braku szczegółowych instrukcji od dostawcy przeciwciał należy zastosować następującą procedurę:

- 5.3.2. Inkubować szkiełka na wilgotnym papierze pod przykryciem przez 30 minut w temperaturze otoczenia (18–25 °C).
- 5.3.3. Strząsnąć krople surowicy ze szkiełek i przepłukać szkiełka starannie buforem IF. Zanurzyć je na 5 minut w buforze IF – Tween (dodatek 4), a następnie w buforze IF. Unikać powstawania aerozoli i przenoszenia kropelek, co mogłoby doprowadzić do kontaminacji między próbkami. Ostrożnie usunąć nadmiar wilgoci przez delikatne osuszanie bibułą.
- 5.3.4. Ułożyć szkiełka na wilgotnym papierze. Pokryć okienka do badań oraz okienko FTIC rozcieńczonym koniugatem FTIC, stosowanym do oznaczania miana. Objętość koniugatu nałożonego na okienka musi być identyczna z objętością zastosowanych przeciwciał.
- 5.3.5. Inkubować szkiełka na wilgotnym papierze pod przykryciem przez 30 minut w temperaturze otoczenia (18–25 °C).
- 5.3.6. Strząsnąć krople surowicy ze szkiełek. Obmyć i przepłukać tak jak poprzednio (5.3.3).

Ostrożnie usunąć nadmiar wilgoci.

- 5.3.7. Na każde okienko nanieść po 5–10 l 0,1 M buforu fosforanowego-glicerynowego (dodatek 4) albo podobną ilość dostępnego w obrocie utrwalacza i przykryć je szkiełkiem nakrywkowym.
- 5.4. Odczytywanie testu IF

- 5.4.1. Sprawdzić szkiełka pod mikroskopem epifluorescencyjnym z filtrem właściwym dla wzbudzenia FITC, pod olejkim imersyjnym lub wodą, przy powiększeniu 500–1 000 razy. Okienka przeglądać wzdłuż dwóch średnic pod kątem prostym oraz dookoła obwodu. Sprawdzić przynajmniej 40 pól mikroskopowych w okienkach niezawierających komórek lub zawierających ich małą ilość.

Sprawdzić najpierw okienko z kontrolą pozytywną. Komórki muszą fluoryzować jasno i być zupełnie wybarwione przy określonym mianie przeciwciał lub rozcieńczeniu roboczym. Badanie IF (sekcja VI.A.5) należy powtórzyć, jeżeli wybarwienie nie jest właściwe.

- 5.4.2. Poszukiwać w okienkach szkiełek testowych jaskrawo fluoryzujących komórek, o charakterystycznej dla *R. solanacearum* morfologii (patrz: strona internetowa <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Intensywność fluorescencji musi być równoważna intensywności wykazywanej przez pozytywny szczep kontrolny przy tym samym rozcieńczeniu surowicy. Komórki niecałkowicie wybarwione lub komórki o słabej fluorescencji należy odrzucić.

W przypadku podejrzenia kontaminacji badanie należy powtórzyć. Tak może być w przypadku gdy wszystkie szkiełka w partii wykazują komórki pozytywne z powodu kontaminacji buforu lub jeśli komórki pozytywne zostają odnalezione (poza okienkami szkiełek) na powierzchni szkiełka.

- 5.4.3. Ze specyficznością testu immunofluorescencyjnego wiąże się nieodłącznie kilka problemów. W osadzie z części przystolonowych bulw ziemniaka i odcinka łodygi prawdopodobne jest występowanie w tle populacji fluoryzujących komórek o nietypowej morfologii oraz bakterii saprofitycznych o wielkości i morfologii podobnej do *R. solanacearum* i dających reakcje krzyżowe.
- 5.4.4. Uwzględnić wyłącznie fluoryzujące komórki o typowych wymiarach i morfologii przy mianie lub rozcieńczeniu roboczym, takim jak w 5.3.

5.4.5. Interpretacja wyników testu IF:

- i) Jeżeli stwierdzono obecność fluoryzujących komórek o charakterystycznej morfologii, trzeba oszacować średnią liczbę typowych komórek w polu widzenia mikroskopu oraz obliczyć liczbę komórek typowych przypadająca na ml ponownie zawieszono osadu (dodatek 5).

Wynik IF jest dodatni dla prób z przynajmniej 5×10^3 komórek na ml zawieszono osadu. Próba uznawana jest za potencjalnie porażoną i wymagane są dalsze testy.

- ii) Odczyt IF jest negatywny dla prób o liczbie komórek mniejszej niż 5×10^3 na ml zawieszono osadu, a próba uznawana jest za negatywną. Kolejne testy nie są wymagane.

6. Test PCR

Zasada

Przy wykorzystaniu testu PCR jako podstawowego badania przesiewowego i uzyskaniu w nim pozytywnego wyniku jako drugie badanie przesiewowe należy wykonać izolację lub test IF. Gdy test PCR jest stosowany jako drugie badanie przesiewowe, a odczyt jest pozytywny, dla zakończenia diagnozy wymagane jest dalsze badanie zgodne ze schematem blokowym.

Pełne wykorzystanie tej metody jako głównego badania przesiewowego zaleca się tylko wtedy, jeśli posiada się specjalistyczną, fachową wiedzę na ten temat.

Uwaga: Wstępne badanie przy użyciu tej metody powinno pozwolić na uzyskanie odtwarzalnego wykrywania rzędu od 10^3 do 10^4 komórek *R. solanacearum* przypadających na ml dodanych do ekstraktów prób, które w poprzednim badaniu wypadły negatywnie. Dla uzyskania maksymalnych poziomów czułości i specyficzności we wszystkich laboratoriach wymagane może być przeprowadzenie eksperymentów optymalizujących.

Należy używać zatwierdzonych odczynników PCR i protokołów (patrz: dodatek 6). Zaleca się wybór metody z kontrolą wewnętrzną.

Należy zastosować odpowiednie środki bezpieczeństwa w celu uniknięcia kontaminacji próbki docelowym DNA. Test PCR powinni wykonywać doświadczeni technicy w wyspecjalizowanych laboratoriach biologii molekularnej, tak aby zminimalizować możliwość kontaminacji docelowym DNA.

Kontrola negatywna (dla ekstrakcji DNA i procedur PCR) powinna być zawsze wykonywana jako ostatnia próba w procedurze tak, aby jasno stwierdzić, czy pojawiło się jakiegokolwiek przeniesienie DNA.

W badaniu PCR należy zawrzeć następujące kontrole negatywne:

- ekstrakt próby, który poprzednio został uznany za negatywny dla *R. solanacearum*,
- próby kontrolne buforu używanego do ekstrakcji bakterii i DNA z próby,
- mieszaninę do reakcji PCR.

Należy zawrzeć następujące kontrole pozytywne::

- zawiesiny osadu, do którego dodano *R. solanacearum* (przygotowanie patrz: dodatek 3 B),
- zawiesinę 10^6 komórek przypadających na ml wirulentnego izolatu *R. solanacearum* zawieszono w wodzie (np. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; patrz: dodatek 3 B),
- w miarę możliwości korzystać również z ekstraktów DNA z kontroli pozytywnych DNA otrzymanych z testu PCR.

Dla uniknięcia potencjalnej kontaminacji, kontrole pozytywne przygotować w miejscu oddzielnym od prób, które mają być badane.

Ekstrakty stanowiące próby powinny być w jak największym stopniu pozbawione ziemi. W pewnych warunkach radzi się więc, aby ekstrakty przygotować z mytych ziemniaków, jeśli mają zostać zastosowane protokoły PCR.

Standaryzowane pozytywne i negatywne materiały kontrolne do wykorzystania w teście są wymienione w dodatku 3.

6.1. Metody oczyszczania DNA

Użyć opisanych powyżej kontroli pozytywnych i negatywnych (patrz: dodatek 3).

Kontrole pozytywne traktować w sposób identyczny, jak próbę(-y).

Dostępnych jest wiele metod oczyszczania docelowego DNA, ze złożonych substratów próby, które usuwają inhibitory PCR i inne reakcje enzymatyczne i koncentrują docelowe DNA w ekstrakcie próby. Metoda przedstawiona poniżej została zoptymalizowana do użytku z zatwierdzoną metodą PCR przedstawioną w dodatku 6.

a) Metoda zgodnie z Pastrik (2000)

1. Odmierzyć pipetą 220 µl buforu do lizy (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) do 1,5 ml próbówki Eppendorfa.
2. Dodać 100 µl ekstraktu i umieścić w jednostce grzewczej lub łaźni wodnej w temp. 95 °C na 10 min.
3. Trzymać próbówkę w lodzie przez 5 min.
4. Dodać 80 µl roztworu lizozymowego (50 mg lizozymu przypadających na ml w 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) i inkubować w temp. 37 °C przez 30 min.
5. Dodać 220 µl roztworu Easy DNA[®] A (Invitrogen), dobrze wymieszać przez worteksowanie i inkubować w temp. 65 °C przez 30 min.
6. Dodać 100 µl roztworu Easy DNA[®] B (Invitrogen), energicznie wymieszać przez worteksowanie, aż w próbówce uwolni się osad i próbka będzie równomiernie lepka.
7. Dodać 500 µl chloroformu i wymieszać przez worteksowanie, aż lepkość spadnie i mieszanina będzie jednorodna.
8. Odwirować przy 15 000 g przez 20 min w temp. 4 °C, aby wytrącić fazy i utworzyć międzyfazę.
9. Przenieść górną fazę do świeżej próbówki typu Eppendorf.
10. Dodać 1 ml 100 % alkoholu etylowego (-20 °C), krótko wymieszać przez worteksowanie i inkubować na lodzie przez 10 min.
11. Wirować przy 15 000 g przez 20 min w temp. 4 °C i usunąć alkohol etylowy z osadu.
12. Dodać 500 µl 80 % alkoholu etylowego (-20 °C) i wymieszać przez odwracanie próbówki.
13. Wirować przy 15 000 g przez 10 min w temp. 4 °C, zostawić osad i usunąć etanol.
14. Zostawić osad do wysuszenia powietrzem lub w wirówce do suszenia DNA.
15. Zawiesić ponownie osad w 100 µl sterylnej UPW i zostawić w temperaturze pokojowej przez przynajmniej 20 minut.
16. Przechowywać w temp. -20 °C, aż będzie potrzebny do badania PCR.
17. Oddzielić wszelki biały osad, wirując i użyć 5 µl zawiesiny zawierającej DNA do testu PCR.

b) Inne metody

Można zastosować inne metody ekstrakcji DNA, np. Qiagen DNeasy Plant Kit, pod warunkiem że dowiedzione zostało, że są równie skuteczne w oczyszczaniu DNA pochodzącego z prób kontrolnych zawierających od 10³ do 10⁴ komórek patogenu przypadających na ml.

6.2. PCR

- 6.2.1. Przygotować matryce testowe i kontrolne dla PCR według zatwierdzonych protokołów (sekcja VI.A.6). Przygotować jedno dziesięciokrotne rozcieńczenie DNA z ekstraktu próby (1:10 w UPW).
- 6.2.2. Przygotować odpowiednią mieszaninę reakcyjną PCR i wymieszać w nieskażonym środowisku zgodnie z opublikowanymi protokołami (dodatek 6). W miarę możliwości radzi się użyć multipleksowego protokołu PCR zawierającego również wewnętrzną kontrolę PCR.
- 6.2.3. Dodać 2–5 µl ekstraktu DNA przypadającego na 25 µl objętości reakcji PCR w sterylnych probówkach do PCR według protokołów PCR (patrz: dodatek 6).
- 6.2.4. Dodać negatywną kontrolę zawierającą tylko mieszaninę reakcyjną PCR. Wymieszać i w miejsce próby dodać to samo źródło UPW, które było używane w mieszaninie PCR.
- 6.2.5. Umieścić probówki w tym samym termocyklerze, który używany był do badań wstępnych i uruchomić właściwie zoptymalizowany program PCR (dodatek 6).

6.3. Analiza produktu PCR

- 6.3.1. Rozdzielić produkty PCR metodą elektroforezy na żelu agarozowym. Użyć przynajmniej 12 µl zwiokrotnionej mieszaniny reakcyjnej DNA z każdej próby zmieszanej z 3 µl buforu obciążającego (dodatek 6) w 2,0 % (w/v) żelu agarozowym w buforze trisacetate-EDTA (TAE) (dodatek 6) przy 5–8 V przypadających na cm. Użyć odpowiedniego markera DNA, np. 100 bp ladder.
- 6.3.2. Uwidocznicić paski DNA odbarwiając żel w bromku etydyny (0,5 mg/l) przez 30–60 min, stosując właściwe środki ostrożności przy obchodzeniu się z tym mutagenem.
- 6.3.3. Oglądać wybarwiony żel w transiluminatorze UV ($\lambda = 302 \text{ nm}$), szukając zamplifikowanych produktów PCR o oczekiwanym rozmiarze (dodatek 6) i udokumentować wyniki.
- 6.3.4. Dla wszystkich nowych wyników/przypadków weryfikować autentyczność amplikonu PCR, przeprowadzając analizę z użyciem enzymów restrykcyjnych na próbce pozostałego zamplifikowanego DNA przez inkubację w optymalnej temperaturze i przez odpowiedni czas z właściwym enzymem i buforem (patrz: dodatek 6). Rozdzielić strawione fragmenty za pomocą elektroforezy na żelu agarozowym jak wcześniej i oglądać charakterystyczny układ fragmentów strawionych przez enzymy restrykcyjne w transiluminatorze UV po uprzednim barwieniu bromkiem etydyny. Porównać z niestrawioną i strawioną kontrolą pozytywną

Interpretacja wyników testu PCR:

Wynik testu PCR jest negatywny, jeśli nie wykryto specyficznego dla *R. solanacearum* fragmentu amplikonu PCR o oczekiwanym rozmiarze w danej próbie, a taki fragment znaleziono we wszystkich kontrolach pozytywnych (w przypadku multipleksowego PCR ze specyficznymi dla rośliny starterami kontroli wewnętrznej; drugi produkt PCR o oczekiwanym rozmiarze musi zostać zamplifikowany w danej próbie).

Wynik testu PCR jest pozytywny, jeżeli wykryto specyficzny amplikon dla *R. solanacearum* o oczekiwanym rozmiarze i wzorze restrykcyjnym (jeśli taki jest wymagany), pod warunkiem, że nie jest on namnożony z jakiegokolwiek negatywnej próby kontrolnej. Wiarygodne potwierdzenie pozytywnego wyniku można również uzyskać, powtarzając badanie przy pomocy drugiego zestawu primerów PCR (dodatek 6).

Uwaga: Może istnieć podejrzenie inhibicji PCR, jeśli oczekiwany amplikon zostanie uzyskany z kontroli pozytywnej zawierającej *R. solanacearum* w wodzie, lecz z pozytywnych prób kontrolnych z *R. solanacearum* w ekstrakcie z ziemiaka uzyskano wyniki negatywne. W multipleksowych protokołach PCR z wewnętrznymi kontrolami PCR, na inhibicję reakcji wskazuje fakt, że nie został uzyskany żaden z dwóch amplikonów.

Jeśli z jednej lub większej ilości kontroli negatywnych uzyskano oczekiwany amplikon, wówczas można podejrzewać kontaminację.

7. Test FISH

Zasada

Jeżeli test FISH używany jest jako pierwsze badanie przesiewowe, a wynik jego jest pozytywny, należy wykonać izolację lub badanie IF jako drugie, obowiązkowe badanie przesiewowe. Gdy test FISH jest stosowany jako drugie badanie przesiewowe, a odczyt jest pozytywny, dla zakończenia diagnozy wymagane jest dalsze badanie zgodne ze schematem blokowym.

Uwaga: Użyć zatwierdzonych, specyficznych dla *R. solanacearum* sond oligonukleotydowych (patrz: dodatek 7). Badanie wstępne przy użyciu tej metody powinno pozwolić na odtwarzalne wykrywanie przynajmniej 10^3 – 10^4 komórek *R. solanacearum* przypadających na ml dodanych do ekstraktów prób, w stosunku do których uprzednio uzyskano wynik negatywny.

Następującą procedurę najlepiej jest stosować w przypadku świeżo przygotowanego ekstraktu z próby, lecz można ją stosować również w odniesieniu do ekstraktu przechowywanego w glicerynie w temperaturze od -16 do -24 °C lub od -68 do -86 °C.

Jako kontroli negatywnej użyć ekstraktu próby, w stosunku do której uprzednio uzyskano wynik negatywny dla *R. solanacearum*.

Jako kontrole pozytywne przygotować zawiesiny zawierające 10^5 do 10^6 komórek przypadających na ml *R. solanacearum* biowar 2 (np. szczep NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857, patrz: dodatek 3) w buforze fosforanowym 0,01M (PB) z 3–5-dniowej hodowli). Przygotować oddzielne szkiełka kontroli pozytywnej z homogenicznego szczepu lub innego szczepu referencyjnego *R. solanacearum*, zawieszono go w ekstrakcie z ziemniaka, zgodnie z opisem w dodatku 3 B.

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

Znormalizowane pozytywne i negatywne materiały kontrolne dostępne do użycia przy tym badaniu wymieniono w dodatku 3 A).

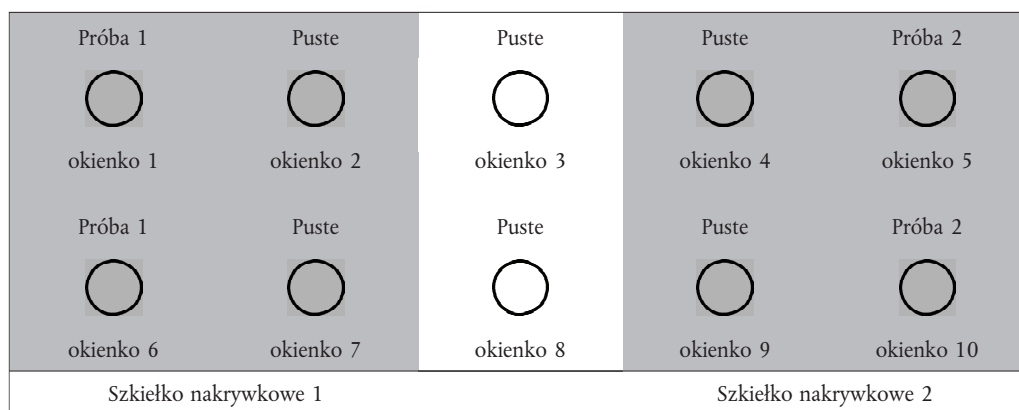
Kontrole pozytywne traktować w sposób identyczny, jak próbę(-y).

7.1. Utrwalanie ekstraktu z ziemniaka

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

- 7.1.1. Przygotować roztwór utrwalający (patrz: dodatek 7).
- 7.1.2. Odmierzyć pipetą 100 µl ekstraktu z każdej próby do probówki Eppendorfa i odwirować przez 7 min przy 7 000 g.
- 7.1.3. Usunąć supernatant i rozpuścić osad w 200 µl utrwalacza przygotowanego < 24 godzin wcześniej. Odwirować i inkubować przez 1 godzinę w lodówce.
- 7.1.4. Odwirować przez 7 min przy 7 000 g, usunąć supernatant i zawiesić ponownie osad w 75 µl 0,01M PB (patrz: dodatek 7).
- 7.1.5. Nanieść po 16 µl utrwalonych zawiesin na czyste szkiełko wielopunktowe tak, jak pokazano na rys. 7.1. Na szkiełko nakładać dwie różne próby, nierozcieńczone i w rozcieńczeniu 1:100, używając 10 µl ekstraktu, aby uzyskać rozcieńczenie 1:100 (w 0,01M PB). Pozostały roztwór próby (49 µl) może być przechowywany w -20 °C po dodaniu 1 objętości 96 % etanolu. W przypadku jeśli test FISH wymaga powtórzenia, usunąć etanol przez wirowanie i dodać tę samą ilość 0,01M PB (zworteksować).

Rysunek 7.1. Rozkład na szkiełku FISH



7.1.6. Wysuszyć szkiełka na powietrzu (lub na płycie do suszenia szkiełek w temperaturze 37 °C) i utrwalić w płomieniu.

W tym momencie procedurę można przerwać i kontynuować hybrydyzację w dniu następnym. Szkiełka powinny być przechowywane w suchym miejscu pozbawionym kurzu, w temperaturze pokojowej.

7.2. Hybrydyzacja

7.2.1. Odwodnić komórki w serii rozcieńczeń alkoholu etylowego o stężeniach 50 %, 80 % i 96 % przez 1 minutę w każdym. Wysuszyć szkiełka na powietrzu w statywie na szkiełka.

7.2.2. Przygotować wilgotną komorę do inkubacji wykładając dno hermetycznego pojemnika bibułą lub papierem filtracyjnym nasączonym w 1x mieszaninie hybrydyzacyjnej (hybmix) (dodatek 7). Wstępnie inkubować pojemnik w cieplarni do hybrydyzacji w temperaturze 45 °C przez przynajmniej 10 minut.

7.2.3. Nanieść po 10 µl roztworu do hybrydyzacji (dodatek 7) na 8 okienek (okienka 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 oraz 10; patrz: rys. 7.1) z każdego szkiełka, pozostawiając dwa okienka środkowe (3 i 8) puste.

7.2.4. Przykryć szkiełkami nakrywkowymi (24 x 24 mm) pierwsze i ostatnie 4 okienka, tak aby nie uwięzić przy tym powietrza. Umieścić szkiełka we wstępnie ogrzanej wilgotnej komorze i hybrydyzować przez 5 godzin w cieplarni w 45 °C w ciemności.

7.2.5. Przygotować 3 zlewki zawierające 1 l Milli Q (stopień molekularny) wody, 1 l 1x mieszaniny hybrydyzacyjnej (334 ml 3x hybmix i 666 ml Milli Q wody) oraz 1 l 1/8x hybmix (42 ml 3x hybmix oraz 958 ml Milli Q wody). Inkubować wstępnie każdą z nich w łaźni wodnej w 45 °C.

7.2.6. Usunąć szkiełka nakrywkowe ze szkiełek i umieścić szkiełka w statywie.

7.2.7. Usunąć nadmiar sondy, inkubując przez 15 min w zlewce z 1x mieszaniny hybrydyzacyjnej w temperaturze 45 °C.

7.2.8. Przenieść statyw do szkiełek do 1/8 hybmix roztworu wymywającego i inkubować przez następne 15 min.

7.2.9. Zanurzyć szkiełka na krótko w Milli Q wodzie i umieścić na bibule filtracyjnej. Usunąć nadmiar wilgoci pokrywając powierzchnie delikatnie bibułą filtracyjną. Odmierzyć pipetą 5–10 µl roztworu utrwalającego zapobiegającego odbarwieniu (np. Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA lub równoważny) na każde okienko i nałożyć duże szkiełko nakrywkowe (24 x 60 mm) na powierzchnię całego szkiełka.

7.3. Odczyt testu FISH

7.3.1. Oglądać szkiełka natychmiast, używając mikroskopu dostosowanego do mikroskopii epifluorescencyjnej pod powiększeniem 630 lub 1 000 x, pod olejkim imersyjnym. Przy filtrze odpowiednim dla izotiocyanianu fluoresceiny (FITC), komórki eubakteryjne (w tym większość komórek Gram ujemnych) są zabarwione na kolor fluorescencyjnie zielony. Przy stosowaniu filtra do 5-izotiocyanianu tetrametylorodaminy barwione komórki *Cy3 R. solanacearum* są fluoryzująco czerwone. Porównać morfologię komórek z tą w kontroli pozytywnej. W przypadku niewłaściwego zabarwienia test FISH (sekcja VI.A.7) należy powtórzyć. Okienka przeglądać wzdłuż dwóch średnic pod kątem prostym oraz dookoła obwodu. Sprawdzić przynajmniej 40 pól mikroskopowych w okienkach niezawierających komórek lub zawierających ich małą ilość.

7.3.2. Poszukiwać w okienkach szkiełek testowych jaskrawo fluoryzujących komórek, o charakterystycznej dla *R. solanacearum* morfologii (patrz: strona internetowa <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Intensywność fluorescencji musi być taka sama lub większa niż szerepu użytego jako kontrola pozytywna. Komórki niecałkowicie wybarwione lub komórki o słabej fluorescencji należy odrzucić.

7.3.3. W przypadku podejrzenia kontaminacji badanie należy powtórzyć. Tak może być w przypadku gdy wszystkie szkiełka w partii pokazują komórki pozytywne z powodu kontaminacji buforu lub jeśli odnalezione zostaną komórki pozytywne (poza okienkami szkiełek) na powierzchni szkiełka.

- 7.3.4. Ze specyficznością testu FISH wiąże się nieodłącznie kilka problemów. W osadzie z części przystolonowych bulw ziemniaka i fragmentów łodygi prawdopodobne jest występowanie w tle populacji fluoryzujących komórek o nietypowej morfologii oraz dających reakcje krzyżowe bakterii saprofitycznych o wielkości i budowie podobnej do *R. solanacearum* choć znacznie rzadziej niż w przypadku testu IF.
- 7.3.5. Pod uwagę brać należy jedynie fluoryzujące komórki o typowym rozmiarze i morfologii.
- 7.3.6. Interpretacja wyników testu FISH:
- Prawidłowe wyniki testu FISH uzyskuje się, jeśli przy użyciu filtra FITC zaobserwuje się jasne zielone komórki fluorescencyjne o rozmiarze i morfologii typowej dla *R. solanacearum* i jeśli zaobserwuje się jasne fluorescencyjne czerwone komórki przy użyciu filtra rodaminowego we wszystkich kontrolach pozytywnych, a nie zaobserwuje się ich w żadnej kontroli negatywnej. Jeżeli stwierdzono obecność fluoryzujących komórek o charakterystycznej morfologii, trzeba oszacować średnią liczbę typowych komórek w polu widzenia mikroskopu oraz obliczyć liczbę komórek typowych przypadającą na ml ponownie zawieszono osadu (dodatek 4). Próbkę o odczycie 5×10^3 typowych komórek przypadających na ml ponownie zawieszono osadu uznaje się za potencjalnie porażone. Konieczne wykonanie jest dalszych badań. Odczyt jest negatywny przy mniej niż 5×10^3 komórek typowych przypadających na ml zawieszono osadu.
 - Test FISH jest negatywny, jeśli fluoryzujące czerwone komórki o rozmiarze i morfologii typowej dla *R. solanacearum* nie zostaną wykryte przy użyciu filtra rodamininy, pod warunkiem zaobserwowania typowych fluoryzujących na czerwono komórek w preparatach kontroli pozytywnych przy użyciu filtra rodaminowego.

8. Testy ELISA

Zasada

Test ELISA może być używany wyłącznie jako badanie fakultatywne wraz z badaniem IF, PCR lub FISH ponieważ ma ono niską czułość. Przy użyciu testu DAS ELISA, konieczne jest zastosowanie wzbogacenia i przeciwciał monoklonalnych (patrz: strona internetowa <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Wzbogacenie prób przed użyciem w teście ELISA może okazać się pomocne dla zwiększenia czułości tego badania, lecz może się nie powieść z powodu konkurencji ze strony innych organizmów obecnych w próbce.

Uwaga: Należy używać zatwierdzonego źródła przeciwciał przeciw *R. solanacearum* (patrz: strona internetowa <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Zaleca się, aby dla każdej nowej partii przeciwciał określać miano. Miano określa się jako największe rozcieńczenie, przy którym pojawia się optymalna reakcja w trakcie badania zawiesiny zawierającej 10^5 do 10^6 komórek przypadających na ml szczepu homogenicznego *R. solanacearum* i przy użyciu właściwych koniugatów przeciwciał zgodnie z zaleceniami producenta. Podczas badań rutynowych używa się dostępnych w handlu przeciwciał w rozcieńczeniu roboczym zbliżonym do wartości miana.

Określić miano przeciwciał na zawiesinie 10^5 do 10^6 komórek przypadających na ml homogenicznego szczepu *R. solanacearum*.

Dołączyć ekstrakt z próby, w przypadku którego uprzednie badanie wykazało negatywne wyniki na *R. solanacearum* i zawiesinę niereagujących krzyżowo bakterii w buforze fosforanowym (PBS) jako kontrolę negatywną.

Jako kontroli pozytywnej użyć ekstraktu próby, w przypadku którego uprzednie badanie dało negatywne wyniki, wymieszanego z 10^3 do 10^4 komórek przypadających na ml *R. solanacearum* biowar 2 (np. szczep NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857, patrz: dodatek 2 A i B). Dla porównania wyników na każdej płycie wykorzystać standardową zawiesinę zawierającą 10^5 do 10^6 komórek przypadających na ml w PBS *R. solanacearum*. Należy upewnić się, że na płycie titracyjnej kontrole pozytywne są właściwie oddzielone od prób badanych.

Znormalizowane pozytywne i negatywne materiały kontrolne dostępne do użycia przy tym badaniu wymieniono w dodatku 3 A.

Kontrole pozytywne traktować w sposób identyczny jak próbę(-y).

Zatwierdzone zostały dwa protokoły testu ELISA:

a) Pośredni test ELISA (Elphinstone i wsp., 1995)

- Użyć 100-200 μ l ekstraktu próby. (Ogrzewanie przez 4 minuty w temperaturze 100°C w łaźni wodnej lub bloku grzewczym może w pewnych wypadkach zredukować niespecyficzne wyniki).
- Dodać tę samą objętość podwójnie stężonego buforu powleającego (dodatek 4) i zworteksować.
- Nałożyć po 100 μ l do każdej z co najmniej dwóch studzienek na płycie (np. Nunc-Polysorp lub równoważny). Inkubować przez 1 godzinę w temperaturze 37°C lub przez noc w temperaturze 4°C .

4. Usunąć ekstrakty ze studzienek. Przepłukać studzienki trzykrotnie buforem PBS-Tween (dodatek 4), pozostawiając w studziencie ostatni roztwór używany do płukania na przynajmniej 5 minut.
5. Przygotować stosowne rozcieńczenia przeciwciał przeciw *R. solanacearum* w buforze blokującym (dodatek 4). W przypadku zatwierdzonych komercyjnych przeciwciał, użyć zalecanych rozcieńczeń (zazwyczaj o stężeniu dwukrotnie większym niż miano).
6. Nałożyć po 100 l do każdej studzienki i inkubować przez 1 godzinę w temperaturze 37 °C.
7. Usunąć roztwór przeciwciał ze studzienek i wypłukać jak poprzednio (pkt 4).
8. Przygotować właściwe rozcieńczenia drugich przeciwciał koniugatu alkalicznej fosfatazy w buforze blokującym. Nałożyć po 100 l do każdej studzienki i inkubować przez 1 godzinę w temperaturze 37 °C.
9. Usunąć koniugaty przeciwciał ze studzienek i wypłukać jak poprzednio (pkt 4).
10. Dodać 100 µl roztworu substratu fosfatazy alkalicznej (dodatek 4) do każdej studzienki. Inkubować w ciemności w temperaturze otoczenia i odczytać absorbancję przy 405 nm w regularnych odstępach, w ciągu 90 minut.

b) DASI ELISA

1. Przygotować stosowne rozcieńczenia przeciwciał poliklonalnych przeciw *R. solanacearum* w buforze powleającym pH 9,6 (dodatek 4). Dodać 200 µl do każdej studzienki. Inkubować w temperaturze 37 °C przez 4–5 godz. lub przy 4 °C przez 16 godz.
2. Wypłukać studzienki trzykrotnie przy użyciu buforu PBS-Tween (dodatek 4).

Dodać 190 µl ekstraktu próby do co najmniej 2 studzienek. Dodać także kontrolę pozytywną i negatywną do dwóch studzienek przypadających na płytkę. Inkubować przez 16 godz. w temperaturze 4 °C.
3. Wypłukać studzienki trzykrotnie przy użyciu buforu PBS-Tween (dodatek 4).
4. Przygotować stosowne rozcieńczenia specyficznych dla *R. solanacearum* przeciwciał monoklonalnych w PBS (dodatek 4) zawierających również 0,5 % albuminy z surowicy bydlęcej (BSA) oraz dodać 190 µl do każdej studzienki. Inkubować w temperaturze 37 °C przez 2 godz.
5. Wypłukać studzienki trzykrotnie przy użyciu buforu PBS-Tween (dodatek 4).
6. Przygotować stosowne rozcieńczenie koniugatu anty-mysich immunoglobulin z fosfatazą alkaliczną w PBS. Dodać 190 µl do każdej studzienki. Inkubować w temperaturze 37 °C przez 2 godz.
7. Wypłukać studzienki trzykrotnie przy użyciu buforu PBS-Tween (dodatek 4).
8. Przygotować roztwór substratu alkalicznej fosfatazy zawierający 1 mg fosfatazy p-nitrofenylu przypadającego na ml buforu substratowego (dodatek 4). Dodać 200 µl do każdej studzienki. Inkubować w ciemności w temperaturze otoczenia i odczytać absorbancję przy 405 nm w regularnych odstępach, w ciągu 90 minut.

Interpretacja wyników testu ELISA

Wynik testu ELISA jest negatywny, gdy średnia gęstość optyczna (OD) odczytywana w dwóch powtórzeniach ze studzienek próby wynosi $< 2x$ OD dla studzienki kontroli negatywnej, pod warunkiem że OD dla kontroli pozytywnych studzienek kontrolnych wynosi powyżej 1,0 (po 90 minutach inkubacji z substratem) i więcej niż podwójna OD uzyskana dla negatywnych ekstraktów prób.

Wynik testu ELISA jest pozytywny, gdy odczyty średniej gęstości optycznej OD próby w dwóch powtórzeniach wynoszą $> 2x$ OD w negatywnym ekstrakcie próby pod warunkiem, że odczyt OD dla wszystkich kontroli pozytywnych wynosi $< 2x$ tych w studzienkach kontroli pozytywnych.

Negatywne odczyty testu ELISA w studzienkach kontroli pozytywnych wskazują, że badanie nie zostało wykonane poprawnie lub że zostało zahamowane. Pozytywne odczyty testu ELISA w studzienkach kontroli negatywnych wskazują na kontaminację lub pojawienie się niespecyficznego wiązania przeciwciał.

9. Test biologiczny

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

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

Protokół ten oparty jest o publikację Janse (1988):

9.1. Dla każdej próby użyć 10 roślin testowych wrażliwej odmiany pomidora (np. »Moneymaker« lub odmiany o podobnej podatności określonej w badaniu laboratoryjnym) w stadium trzeciego właściwego liścia. Szczegóły hodowli zamieszczono w dodatku 8. Alternatywnie można użyć roślin oberżyny (np. odmiany »Black Beauty« lub odmian o podobnej podatności), używać wyłącznie roślin w stadium 2–3 liści do pełnego rozwoju trzeciego liścia właściwego. Wykazano, że w przypadku użycia oberżyny obserwowane symptomy były słabsze i rozwijały się wolniej. W miarę możliwości zaleca się używanie sadzonek pomidora.

9.2. Rozdzielić po 100 µl ekstraktu próby pomiędzy rośliny testowe.

9.2.1. Inokulacja za pomocą strzykawki

Inokulować łądgi roślin powyżej liścieni za pomocą strzykawki z igłą do iniekcji podskórnej (nie mniejszej niż 23 G). Próbę rozdzielić między rośliny testowe.

9.2.2. Inokulacja przez nacięcie

Trzymając roślinę między dwoma palcami, nanieść na łądżę kroplę (średnio 5–10 µl) zawieszonego osadu w miejscu między liścieniami i pierwszym liściem.

Za pomocą sterylnego skalpela wykonać ukośne nacięcie, o długości 1,0 cm i na głębokość średnio 2/3 grubości łądży, rozpoczynając od miejsca naniesienia kropli osadu.

Ranę zamknąć sterylną wazeliną ze strzykawki.

9.3. Stosując tę samą technikę, zainokulować 5 sadzonek zawiesiną wodną 10^5 do 10^6 komórek przypadających na ml, przygotowaną z 48 godz. kultury wirulentnego biowar 2 szczepu *R. solanacearum* jako kontrolę pozytywną oraz buforem do zawieszania osadu (dodatek 4) jako kontrolę negatywną. W celu uniknięcia kontaminacji oddzielić kontrolę pozytywną i negatywną od pozostałych roślin testowych.

9.4. Utrzymywać rośliny testowe w warunkach kwarantanny przez okres do 4 tygodni, w temperaturze 25–30 °C w wilgotności względnej z właściwym podlewaniem, aby zapobiec podtopieniu lub wędnięciu z powodu braku wody. Dla uniknięcia kontaminacji inkubować rośliny zainokulowanej kontroli pozytywnej i negatywnej na wyraźnie oddzielonych stołach w szklarni lub komorze wzrostu lub, w przypadku ograniczonej przestrzeni, zapewnić restrykcyjne oddzielenie pomiędzy procesami. Jeśli rośliny należące do różnych prób muszą być inkubowane w pobliżu, oddzielić je odpowiednimi ekranami. Przy nawożeniu, podlewaniu, kontrolowaniu i innych procedurach, należy bardzo uważać, aby unikać kontaminacji. Bardzo ważne jest, aby w szklarni lub komorze hodowlanej nie było żadnych owadów, ponieważ mogą one z próby na próbę przenosić bakterie.

Obserwować objawy wędnięcia, epinastii, chlorozy i/lub zahamowania rozwoju.

- 9.5. Wyizolować z porażonych roślin (sekcja II.3) i zidentyfikować oczyszczone kultury typowe dla *R. solanacearum* (sekcja VI. B).
- 9.6. Jeśli w okresie 3 tygodni nie zaobserwuje się żadnych objawów, wykonać IF/PCR/izolację na próbie zbiorczej złożonej z 1 cm fragmentów łodyg każdej badanej rośliny wziętej z odcinka powyżej miejsca inokulacji. Jeśli wynik testu jest pozytywny, wykonać posiew metodą rozcieńczeń płytkowych (sekcja 4.1).
- 9.7. Zidentyfikować wszelkie oczyszczone kultury typowe dla *R. solanacearum* (sekcja VI. B).

Interpretacja wyników testu biologicznego:

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

Test biologiczny daje wynik negatywny, jeżeli rośliny nie zostały porażone przez *R. solanacearum*, pod warunkiem że obecność kultury *R. solanacearum* wykryto w kontrolach pozytywnych.

Test biologiczny daje wynik pozytywny, gdy rośliny testowe są porażone przez *R. solanacearum*.

B. TESTY IDENTYFIKACYJNE

Zidentyfikować czyste kultury typowe dla *R. solanacearum* przy użyciu co najmniej dwóch z poniższych testów opartych na różnych zasadach biologicznych.

Dołączyć znane szczepy referencyjne, tam gdzie to stosowne, dla każdego wykonywanego badania (patrz: dodatek 3).

1. Testy fizjologiczne i biochemiczne

Określić następujące właściwości fenotypu, które standardowo występują lub nie w *R. solanacearum*, zgodnie z metodami Lelliotta i Steada (1987), Klementa *et al.* (1990), Schaad (2001).

Test	Oczekiwany wynik
Produkcja barwnika fluorescencyjnego	–
Obecność poli-β -hydroksymaślanu	+
Test oksydacyjno/fermentacyjny (O/F)	O+/F–
Katalaza	+
Aktywność oksydazy	+
Redukcja azotanu	+
Wykorzystywanie cytrynianu	+
Wzrost przy 40 °C	–
Wzrost w 1 % NaCl	+
Wzrost w 2 % NaCl	–
Aktywność hydrolazy argininy	–
Upłynnianie żelatyny	–
Hydroliza skrobi	–
Hydroliza esuliny	–
Produkcja lewanu	–

2. Test IF

- 2.1. Przygotować zawiesinę około 10⁶ komórek przypadających na ml w buforze IF (dodatek 4).
- 2.2. Przygotować serię dwukrotnych rozcieńczeń odpowiedniej surowicy (patrz: strona internetowa <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).
- 2.3. Zastosować procedurę IF (sekcja VI.A.5).
- 2.4. Wynik testu IF jest dodatni, jeśli miano IF badanej kultury jest równoważne mianu z kontroli pozytywnej.

3. Test ELISA

Uwaga: Jeżeli wykonywane są tylko 2 testy identyfikacyjne, poza tą metodą, nie należy używać kolejnego badania serologicznego.

- 3.1. Przygotować zawiesinę około 10^8 komórek przypadających na ml 1X PBS (dodatek 4).
- 3.2. Zastosować odpowiednią procedurę testu ELISA ze specyficznymi przeciwciałami monoklonalnymi przeciw *R. solanacearum*.
- 3.3. Wynik testu ELISA jest dodatni, jeśli odczyt ELISA uzyskany z badanej kultury wynosi przynajmniej połowę tego uzyskanego dla kontroli pozytywnej.

4. Test PCR

- 4.1. Przygotować zawiesinę około 10^6 komórek przypadających na ml w sterylnej wodzie o stopniu molekularnym.
- 4.2. Podgrzać 100 μ l zawiesiny komórek w zamkniętych probówkach w bloku grzejnym lub wrzącej łaźni wodnej w temperaturze 100 °C przez 4 minuty. Próbkę mogą być następnie przechowywane do momentu, kiedy będą potrzebne w temp. od -16 do -24 °C.
- 4.3. Użyć właściwych procedur PCR dla namnożenia specyficznych dla *R. solanacearum* amplikonów (np. Seal *et al.* (1993); Pastrik i Maiss (2000); Pastrik *et al.* (2002); Boudazin *et al.* (1999); Opina *et al.* (1997), Weller *et al.* (1999)).
- 4.4. Pozytywna identyfikacja *R. solanacearum* następuje, jeśli amplikony PCR są tego samego rozmiaru i posiadają te same polimorfizmy restrykcyjne długości fragmentu, co dla szczepu kontroli pozytywnej.

5. Test FISH

- 5.1. Przygotować zawiesinę około 10^6 komórek przypadających na ml w UPW.
- 5.2. Zastosować procedurę FISH (sekcja VI.A.7) przynajmniej z dwoma pozytywnymi specyficznymi dla *R. solanacearum* sondami oligonukleotydowymi (dodatek 7).
- 5.3. Wynik testu FISH jest dodatni, jeśli takie same reakcje uzyskuje się z kultury badanej oraz kontroli pozytywnej.

6. Analiza kwasów tłuszczowych (FAP)

- 6.1. Hodować kulturę na trypticase soy agar (Oxoid) przez 48 godzin w temperaturze 28 °C.
- 6.2. Zastosować odpowiednią metodę FAP (Janse, 1991; Stead, 1992).
- 6.3. Badanie FAP daje wynik pozytywny, gdy profil kultury badanej jest identyczny z profilem dla kontroli pozytywnej. Obecność charakterystycznych kwasów tłuszczowych takich jak 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH oraz 18:1 2OH, a brak 16:0 3OH w dużym w stopniu wskazuje na występowanie *Ralstonia sp.*

7. Metoda oznaczania szczepu

Wykonanie oznaczenia szczepu przy użyciu z jednej z następujących metod zaleca się dla każdego nowego przypadku izolacji *R. solanacearum*.

Dołączyć znane szczepy referencyjne, tam gdzie to stosowne, dla każdego wykonywanego badania (patrz: dodatek 3).

7.1. Określenie biowaru

R. solanacearum dzieli się na biowary ze względu na ich zdolność do wytwarzania i/lub utleniania trzech cukrów i trzech alkoholi heksozowych (Hayward, 1964 i Hayward *et al.*, 1990). Podłoże wzrostowe do badania browarów opisano w dodatku 2. Badanie można z powodzeniem wykonać szczepiąc podłoże czystymi kulturami *R. solanacearum* i inkubując w temperaturze 28 °C. Jeśli podłoże rozdzieli się do sterylnych 96 studzienek płytki (200 μ l na studzienkę), w ciągu 72 godzin można zaobserwować zmianę barwy z oliwkowo zielonej na żółtą, co wskazuje na pozytywny wynik badania.

	Biowar				
	1	2	3	4	5
Wykorzystanie:					
Maltozy	–	+	+	–	+
Laktozy	–	+	+	–	+
D (+) celobiozy	–	+	+	–	+
Mannitolu	–	–	+	+	+
Sorbitolu	–	–	+	+	–
Dulcytolu	–	–	+	+	–

Dodatkowe badania różnicujące biowar 2 na podfenotypy

	Biovar 2A (Na całym świecie)	Biovar 2A (W Chile i Kolumbii)	Biovar 2T (W obszarach tropikalnych)
Wykorzystanie trehalozy	–	+	+
Wykorzystanie mezoinozytolu	+	–	+
Wykorzystanie D-rybozy	–	–	+
Aktywność pektolityczna ⁽¹⁾	niska	niska	wysoka

⁽¹⁾ Patrz: Lelliott and Stead (1987)

7.2. Genomowe fingerprinting

Różnicowanie molekularne szczepów kompleksu *R. solanacearum* można zrealizować na drodze kilku technik, w tym:

7.2.1. Analizę restrykcyjnego polimorfizmu długości fragmentu (RFLP) (Cook *et al.*, 1989).

7.2.2. Powtarzanego sekwencjonowania PCR przy użyciu REP, BOX i starterów ERIC (Louws *et al.*, 1995; Smith *et al.* (1995).

7.2.3. Analizę mnożonego polimorfizmu długości fragmentu (AFLP) (Van der Wolf *et al.*, 1998).

7.3. Metody PCR

Specyficzne startery PCR (Pastrik *et al.*, 2002; patrz: dodatek 6) można użyć do rozróżnienia szczepów należących do działu 1 (biowary 3, 4 i 5) i działu 2 (biowary 1, 2A i 2T) *R. solanacearum*, zgodnie z pierwotną definicją analizy RFLP (Cook *et al.*, 1989) oraz 16S sekwencjonowania rDNA (Taghavi *et al.*, 1996).

C. TESTY POTWIERDZAJĄCE

Test patogeniczności musi być wykonany jako końcowe potwierdzenie diagnozy występowania *R. solanacearum* oraz do określania wirulencji kultur zidentyfikowanych jako *R. solanacearum*.

1. Przygotować inokulum 10^6 komórek na 1 ml z badanej kultury hodowanej przez 24–48 godzin i szczep kontroli pozytywnej *R. solanacearum* (np. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; patrz: dodatek 3).
2. Zainokulować 5–10 wrażliwych sadzonek pomidora lub oserżyny w stadium trzeciego właściwego liścia (Patrz: sekcja VI.A.9).

3. Inkubować przez okres do 2 tygodni w temperaturze 25–28 °C w wysokiej wilgotności względnej z właściwym podlewaniem, aby zapobiec powstaniu stresu z powodu podtopienia lub zbytniego wysuszenia. Przy czystych kulturach, typowe wędnięcie powinno się uzyskać w ciągu 15 dni. Jeśli po tym okresie nie ma objawów, nie można potwierdzić, że kultura jest patogeniczną formą *R. solanacearum*.
 4. Izolacji dokonywać z roślin wykazujących objawy porażenia w następujący sposób.
 5. Pobrać wycinek tkanki z łodygi, 2 cm powyżej punktu inokulacji. Rozdrobnić ją i zawiesić w małej objętości sterylnej wody destylowanej lub 50 mM buforu fosforanowego (dodatek 4). Izolować z zawiesiny poprzez naniesienie rozcieńczenia na odpowiednią pożywkę, najlepiej na pożywkę selektywną (dodatek 2), inkubować przez 48–72 godzin w temperaturze 28 °C i sprawdzić, czy pojawiły się typowe kolonie *R. solanacearum*.
-

Dodatek 1

Laboratoria zajmujące się optymalizacją i zatwierdzeniem protokołów

Laboratorium ⁽¹⁾	Miasto	Państwo
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Wiedeń i Linz	Austria
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Belgia
Plantedirektoratet	Lyngby	Dania
Central Science Laboratory	York	Anglia
Scottish Agricultural Science Agency	Edynburg	Szkocja
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	Francja
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Francja
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Niemcy
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Niemcy
State Laboratory	Dublin	Irlandia
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali	Bolonia	Włochy
Regione Veneto Unità Periferica per i Servizi Fitosanitari	Werona	Włochy
Nederlandse Algemene Keuringsdienst	Emmeloord	Holandia
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Holandia
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lizbona	Portugalia
Centro Diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	Hiszpania
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias	Walencja	Hiszpania
Swedish University of Agricultural Sciences	Uppsala	Szwecja

⁽¹⁾ Naukowcy będący osobami kontaktowymi: patrz: strona internetowa <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

Dodatek 2

Pożywki do izolacji i hodowli *R. solanacearum***a) Ogólne pożywki do hodowli***Pożywka agarowa (NA)*

Nutrient Agar (Difco) 23,0 g

Woda destylowana 1,0 l

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

Agar drożdżowo-peptonowo-glukozowy (YPGA)

Yeast extract (Difco) 5,0 g

Bacto-Peptone (Difco) 5,0 g

Monohydrat D(+) glukozy 10,0 g

Bacto-Agar (Difco) 15,0 g

Woda destylowana 1,0 l

Rozpuścić składniki i sterylizować w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 15 minut.

Agar sacharozowo-peptonowy (SPA)

Sacharoza 20,0 g

Bacto-Peptone (Difco) 5,0 g

K₂HPO₄ 0,5 gMgSO₄·7H₂O 0,25 g

Bacto-Agar (Difco) 15,0 g

Woda destylowana 1,0 l

pH 7,2–7,4

Rozpuścić składniki i sterylizować w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 15 minut.

Pożywka tetrazolowa Kelmana

Casamino acids (Difco) 1,0 g

Bacto-Peptone (Difco) 10,0 g

Dekstroza 5,0 g

Bacto-Agar (Difco) 15,0 g

Woda destylowana 1,0 l

Rozpuścić składniki i sterylizować w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 15 minut.

Oziębnić do 50°C i dodać sterylizowany przez filtr roztwór wodny 2,3,5 chlorku trifenylo-tetrazolowego (Sigma), tak by otrzymać stężenie końcowe 50 mg/l.

b) Zatwierdzone pożywki selektywne do hodowli*Pożywka SMSA (Englebrecht, 1994 zmodyfikowane przez Elphinstone et al., 1996)**Pożywka podstawowa*

Casamino acids (Difco) 1,0 g

Bacto-Peptone (Difco) 10,0 g

Gliceryna 5,0 ml

Bacto-Agar (Difco) (patrz: Uwaga 2) 15,0 g

Woda destylowana 1,0 l

Rozpuścić składniki i sterylizować w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 15 minut

Oziębic do 50 °C i dodać sterylizowany przez filtr roztwór wodny następujących składników w celu uzyskania określonych stężeń końcowych:

Fiolet krystaliczny (Sigma)	5 mg na l
Siarczan polimyksyny B	(Sigma P-1004) 600 000 U (około 100 mg) na l
Bacytracyna (Sigma B-0125)	1 250 U (około 25 mg) na l
Chloroamfenikol (Sigma C-3175)	5 mg na l
Penicylina-G (Sigma P-3032)	825 U (około 0,5 mg) na l
2,3,5 chlorek trifenilo-tetrazolowy (Sigma)	50 mg na l

Uwaga:

1. Używanie odczynników innych niż wskazane powyżej może mieć wpływ na hodowlę *R. solanacearum*.
2. Oxoid Agar #1 można użyć zamiast Bacto-agar (Difco). W tym wypadku, wzrost *R. solanacearum* będzie wolniejszy, choć można zmniejszyć też wzrost konkurujących saprofitów. Typowe dla *R. solanacearum* kolonie mogą formować się 1–2 dni dłużej, a czerwony kolor może być jaśniejszy i bardziej rozproszony niż na Bacto-Agar.
3. Zwiększenie stężenia bacytracyny do 2 500 U/l może zredukować populację konkurujących bakterii bez wpływu na wzrost *R. solanacearum*.

Pożywki i roztwory antybiotyków przechowywać w temperaturze 4 °C w ciemnym miejscu i wykorzystać w ciągu miesiąca.

Przed użyciem z płytek należy usunąć skropliny, jakie wytwarzają się na powierzchni.

Należy unikać nadmiernego wysuszenia płytek.

Kontrolę jakości powinno się wykonać po przygotowaniu każdej nowej partii pożywki poprzez nałożenie na płytki zawiesiny kultury referencyjnej *R. solanacearum* (patrz: dodatek 3) i obserwowanie formowania się typowych kolonii po inkubacji w temperaturze 28 °C przez 2–5 dni.

c) **Zatwierdzona pożywka do wzbogacenia**

Pożywka SMSA (Elphinstone *et al.*, 1996)

Przygotować tak jak pożywkę agarową selektywną SMSA, lecz pominąć Bacto-Agar i 2,3,5 chlorek trójfenylo-tetrazolowy.

Zmodyfikowana pożywka Wilbrink (Caruso *et al.*, 2002)

Sacharoza	10 g
Proteose peptone	5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,25 g
NaNO ₃	0,25 g
Woda destylowana	1 l

Sterylizować pożywkę w autoklawie, w temp. 121 °C, przez 15 minut i ochłodzić do 50 °C

Dodać roztwory antybiotyków jak dla pożywki SMSA.

Dodatek 3

A. Dostępne w handlu znormalizowane materiały kontrolne

a) Szczepy bakterii

Do użycia jako standardowy materiał referencyjny zaleca się następujący szczep bakteryjny do przygotowania kontroli pozytywnych (tabela 1) lub w trakcie optymalizacji badań dla uniknięcia reakcji krzyżowych (tabela 2). Wszystkie szczepy są ogólnie dostępne w handlu w następujących podmiotach:

1. National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPBP), Central Science Laboratory, York, UK.
2. Culture Collection of the Plant Protection Service (PD), Wageningen, Niderlandy.
3. Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP), INRA Station Phytobactériologie, Angers, Francja.

Tabela 1 Panel referencyjny SMT szczepów *R. solanacearum*

Kod NCPBP	SMT #	Pozostałe kody	Kraj pochodzenia	Biowar
NCPBP 4153	6	CFBP 4582, Pr 3020, EURS11	Egipt	2
NCPBP 4154	10	CFBP 4585, 550, EURS21	Turcja	2
NCPBP 3857	12	CFBP 4587, Pr 1140, EURS26	Anglia	2
NCPBP 1584	23	CFBP 4598, EURS49	Cypr	2
NCPBP 2505	24	CFBP 4599, EURS50	Szwecja	2
NCPBP 4155	26	CFBP 4601, 502, EURS55	Belgia	2
NCPBP 4156 (*)	71 (*)	PD 2762, CFBP 3857	Holandia	2
NCPBP 4157	66	LNPV 15.59	Francja	2
NCPBP 4158	39	CFBP 4608, Port 448, EURS80	Portugalia	2
NCPBP 4160	69	IVIA-1632-2	Hiszpania	2
NCPBP 4161	76	B3B	Niemcy	2
NCPBP 325	41	CFBP 2047, KEL60-1, R842	USA	1
NCPBP 3967	42	CFBP 4610, R285, GONG7	Kostaryka	1
NCPBP 4028	43	CFBP 4611, R303/571, CIP310, SEQ205	Kolumbia	2
NCPBP 3985	44	CFBP 4612, R578, CIP312	Peru	2T
NCPBP 3989	45	CFBP 4613, R568, CIP226	Brazylia	2T
NCPBP 3996	46	CFBP 3928, R276/355, CIP72, SEQ225	Peru	3
NCPBP 3997	47	CFBP 4614, R280/363, CIP49, HAY0131a	Australia	3
NCPBP 4029	48	CFBP 4615, R297/349, CIP121, CM1b2861	Sri Lanka	4
NCPBP 4005	49	CFBP 4616, R470	Filipiny	4
NCPBP 4011	50	CFBP 4617, R288, HEmps2	Chiny	5

(*) Stosować jako standardowe szczepy referencyjne *R. solanacearum* biowar 2 (rasa 3).

Uwaga: Autentyczność powyższych szczepów może być zagwarantowana tylko wówczas, gdy zostały one pozyskane z autentycznego zbioru hodowli.

Tabela 2 Panel referencyjny SMT i związanych serologicznie lub genetycznie bakterii do stosowania przy optymalizacji badań wykrywania.

Kod NCPPB	SMT #	Pozostałe kody	Identyfikacja
NCPPB 4162	51	CFBP 1954	<i>Bacillus polymyxa</i> ⁽¹⁾
NCPPB 4163	52	CFBP 1538	<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i> ⁽¹⁾
NCPPB 4164	—	CFBP 2227	<i>Burkholderia cepacia</i> ⁽²⁾
NCPPB 4165	—	CFBP 2459	<i>Ralstonia pickettii</i> ⁽²⁾
NCPPB 4166	58	CFBP 3567 CSL Pr1150	<i>Ralstonia pickettii</i> ⁽¹⁾
NCPPB 4167	60	CFBP 4618 PD 2778	<i>Ralstonia</i> sp. ⁽¹⁾
NCPPB 1127	53	CFBP 3575	<i>Burkholderia andropogonis</i> ⁽¹⁾
NCPPB 353	54	CFBP 3572	<i>Burkholderia caryophylli</i> ⁽¹⁾
NCPPB 945	55	CFBP 3569	<i>Burkholderia cepacia</i> ⁽¹⁾
NCPPB 3708	56	CFBP 3574	<i>Burkholderia glumae</i> ⁽¹⁾
NCPPB 3590	57	CFBP 3573	<i>Burkholderia plantarii</i> ⁽¹⁾
NCPPB 3726	59	CFBP 3568	<i>Banana Blood Disease Bacterium</i> ⁽¹⁾ ⁽²⁾ ⁽³⁾
NCPPB 4168	61	CFBP 4619 IPO S339	<i>Enterobacter</i> sp. ⁽¹⁾
NCPPB 4169	62	IPO 1695	<i>Enterobacter</i> sp. ⁽¹⁾
NCPPB 4170	63	CFBP 4621 IPO S306	<i>Ochrobactrum anthropi</i> ⁽¹⁾ ⁽²⁾
NCPPB 4171	64	CFBP 4622 IPO 1693	<i>Curtobacterium</i> sp. ⁽¹⁾ ⁽²⁾
NCPPB 4172	65	IPO 1696a	<i>Pseudomonas</i> sp. ⁽¹⁾
NCPPB 4173	—	PD 2318	<i>Aureobacterium</i> sp. ⁽²⁾
NCPPB 4174	81	IVIA 1 844,06	<i>Flavobacterium</i> sp. ⁽¹⁾ ⁽²⁾

⁽¹⁾ Potencjalny szczep reagujący krzyżowo w badaniach serologicznych (IF i/lub ELISA) z antyusurowicą poliklonalną.

⁽²⁾ Szczep, z którego można rozmnożyć produkt PCR w pewnych laboratoriach o podobnym rozmiarze do tego, jakiego się oczekuje przy użyciu specyficznych primerów OLI-1 oraz Y-2 (patrz: dodatek 6).

⁽³⁾ Prawdopodobna reakcja krzyżowa w większości badań, lecz znany z występowania tylko na bananach w Indonezji.

b) Dostępne w handlu znormalizowane materiały kontrolne

Następujące standardowe materiały kontrolne są dostępne ze zbiorów hodowlanych NCPPB.

Zamrozić wysuszony osad ekstraktu ziemniaka z 200 zdrowych bulw jako kontrolę negatywną dla wszystkich testów.

Zamrozić wysuszony osad ekstrakt ziemniaka z 200 zdrowych bulw zawierających od 10^3 do 10^4 i 10^4 do 10^6 komórek *R. solanacearum* biowar 2 (szczep NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) jako pozytywne kontrole dla testu serologicznego i testu PCR. Jako że żywotność komórek jest w trakcie zamrażania i suszenia obniżana, nie nadają się one jako standardowe próby kontrolne do badań izolacji lub testów biologicznych.

Zawiesiny utrwalane w formalinie *R. solanacearum* biowar 2 (szczep NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) przy 10^6 komórek przypadających na ml jako pozytywne kontrole do testów serologicznych.

B. Przygotowanie kontroli pozytywnych i negatywnych testów przesiewowych PCR/IF i FISH

Wytworzyć kulturę 48-godzinną wirulentnego szczepu *R. solanacearum* rasa3/biowar2 (np. szczep NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) na uniwersalnej pożywce SMSA i zawiesić w 10 mM buforze fosforanowym dla uzyskania gęstości około 2×10^8 cfu przypadających na ml. Uzyskuje się zwykle lekko mętną zawiesinę odpowiadającą gęstości optycznej 0,15 przy 600 nm.

Pobrać części przystolonowe z 200 bulw ziemniaków odmiany o białej skórce, o których wiadomo, że są wolne od *R. solanacearum*.

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

Przygotować 10 sterylnych mikrofiolk 1,5 ml z 900 µl zawieszonego osadu.

Przenieść 100 µl zawiesiny *R. solanacearum* do pierwszej mikrofiolki. Zworteksować.

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

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

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

Obecność i liczebność *R. solanacearum* w próbach kontrolnych należy najpierw potwierdzić przez test IF.

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

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

W przypadku testów IF, FISH i PCR *R. solanacearum* musi zostać wykryty w przynajmniej 10^6 i 10^4 komórek/ml kontroli pozytywnej i nie wykryty w żadnej kontroli negatywnej.

Dodatek 4

Skład buforów i sposób ich przygotowania

UWAGI OGÓLNE: Zamknięte sterylne bufony można przechowywać do jednego roku

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

Ten bufor jest używany do ekstrakcji bakterii z tkanek rośliny poprzez homogenizację lub wstrząsanie.

Na ₂ HPO ₄ (bezwodny)	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
Woda destylowana	1,00 l

Rozpuścić składniki, sprawdzić wartość pH i wysterylizować przy użyciu autoklawu w temperaturze 121 °C przez 15 min.

Przydatne mogą być następujące dodatkowe składniki:

	<i>Cel</i>	<i>Ilość (na l)</i>
Lubrol w płatkach	Czynnik deflokulacyjny (*)	0,5 g
Czynnik antypieniący (Silicone DC)	Czynnik antypieniący (*)	1,0 ml
Pirofosforan czterosodowy	Antyutleniacz	1,0 g
Poliwinylopirolidon-40000 (PVP-40)	Wiązane inhibitorów PCR	50 g

(*) Do stosowania w przypadku metody ekstrakcji przez homogenizacji.

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

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

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,4 g
Woda destylowana	1,0 l

Rozpuścić składniki, sprawdzić wartość pH i wysterylizować przy użyciu autoklawu w temperaturze 121 °C przez 15 min.

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

Bufor jest używany do rozpuszczania przeciwciał

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,4 g
NaCl	8,0 g
Woda destylowana	1,0 l

Rozpuścić składniki, sprawdzić wartość pH i wysterylizować przy użyciu autoklawu w temperaturze 121 °C przez 15 min.

2.2. Bufor IF-Tween

Bufor ten stosowany jest do płukania szkiełek.

Dodać 0,1 % Tween 20 do buforu IF.

2.3. Bufor glicerynowo-fosforanowy, pH 7,6

Bufor ten jest dodawany na okienka szkiełek IF, w celu zwiększenia fluorescencji.

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

Roztwory utrwalające o działaniu przeciwdobarwiającym są dostępne np. w Vectashield® (Vector Laboratories) lub Citifluor® (Leica).

3. Bufory do pośredniego testu ELISA

3.1. Podwójnie stężony bufor powlekający, pH 9,6

Na ₂ CO ₃	6,36 g
NaHCO ₃	11,72 g
Woda destylowana	1,00 l

Rozpuścić składniki, sprawdzić wartość pH i wysterylizować przy użyciu autoklawu w temperaturze 121 °C przez 15 min.

Można dodać siarczek sodu jako antyutleniacz dla wyeliminowania nagromadzenia się utlenionych związków substancji aromatycznych.

3.2. 10 X bufor fosforanowy (PBS), pH 7,4

NaCl	80,0 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	29,0 g
KCl	2,0 g
Woda destylowana	1,0 l

3.3. PBS-Tween

10X PBS	100 ml
10 % Tween 20	5 ml
Woda destylowana	895 ml

3.4. Bufor blokujący (przeciwciała) (należy go przygotowywać na krótko przed wykorzystaniem)

10X PBS	10,0 ml
Poliwinylopirolidon-44000 (PVP-44)	2,0 g
10 % Tween 20	0,5 ml
Mleko w proszku	0,5 g
Woda destylowana	uzupełnić do 100 ml

3.5. Roztwór substratu alkalicznej fosfatazy buforze fosforanowym, pH 9,8

Dietanoloamina	97 ml
Woda destylowana	800 ml

Mieszać i ustawić pH na 9,8 za pomocą stężonego roztworu HCl

Uzupełnić wodą destylowaną do 1 l.

Dodać 0,2 g $MgCl_2$.

Rozpuścić po dwie tabletki substratu fosfatazy po 5 mg (Sigma) w 15 ml roztworu.

4. Bufory do testu DASI ELISA

4.1. Bufor powlekający, pH 9,6

Na_2CO_3	1,59 g
$NaHCO_3$	2,93 g
Woda destylowana	1 000 ml

Rozpuścić składniki i sprawdzić pH.

4.2. 10 X bufor fosforanowy (PBS), pH 7,2–7,4

NaCl	80,0 g
$NaH_2PO_4 \cdot 2 H_2O$	4,0 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	27,0 g
Woda destylowana	1 000 ml

4.3. PBS-Tween

10X PBS	50 ml
10 % Tween 20	5 ml
Woda destylowana	950 ml

4.4. Bufor substratowy, pH 9,8

Dietanoloamina	100 ml
Woda destylowana	900 ml

Mieszać i ustawić pH na 9,8 za pomocą stężonego roztworu HCl.

Dodatek 5

Określenie poziomu porażenia w testach IF i FISH

1. Policzyc średnią liczbę typowych komórek fluorescencyjnych przypadających na pole widzenia (c).
2. Obliczyć liczbę typowych komórek fluorescencyjnych przypadających na okienko szkiełka mikroskopu (C).

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

gdzie S = pole powierzchni okienka szkiełka wielopunktowego;

oraz s = pole powierzchni obiektywu;

$s = \pi^2/4G^2K^2$ gdzie i = współczynnik pola (zależy od rodzaju okularu i zmienia się od 8 do 24);

K = współczynnik tubusa (1 lub 1,25);

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

3. Obliczyć liczbę typowych komórek fluorescencyjnych przypadających na ml zawieszonego osadu (N).

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

gdzie y = objętość ponownie zawieszonego osadu w każdym okienku;

oraz F = współczynnik rozcieńczenia zawieszonego osadu.

Dodatek 6

Zatwierdzone protokoły PCR i odczynniki

Uwaga: Wstępne badanie powinno pozwolić na odtwarzalne wykrywanie od 10^3 do 10^4 komórek *R. solanacearum* przypadających na ml ekstraktu.

Wstępne badanie powinno wykazać również brak fałszywie pozytywnych wyników przy panelu wybranych szczepów bakteryjnych (patrz: dodatek 3).

1. Protokół PCR Seal et al. (1993)

1.1. Primery oligonukleotydowe

Primer przedni OLI-1 5'-GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC-3'

Primer tylny Y-2 5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'

Oczekiwany rozmiar ampliconu z *R. solanacearum* matrycy DNA = 288 bp

1.2. Mieszanina reakcji PCR

Odczynnik	Ilość przypadająca na reakcję	Stężenie końcowe
Sterylna woda ultra czysta (UPW)	17,65 µl	
10X PCR bufor (1) (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
Mieszania dNTP (20mM)	0,25 µl	0,2 mM
Starter OLI-1 (20µM)	1,25 µl	1 µM
Starter Y-2 (20µM)	1,25 µl	1 µM
Polimeraza Taq (5U/µl) (1)	0,1 µl	0,5 U
Objętość próby	2,0 µl	
Objętość całkowita	25 µl	

(1) Metoda została zatwierdzona przy użyciu polimerazy Taq od Perkin Elmer (AmpliTaq) i Gibco BRL.

1.3. Warunki reakcji PCR

Przeprowadzić następujący program:

- 1 cykl: i) 2 minuty w temperaturze 96 °C: (denaturacja matrycy DNA)
- 35 cykli: ii) 20 sekund w temperaturze 94 °C (denaturacja matrycy DNA)
- iii) 20 sekund w temperaturze 68 °C (dołączanie primerów)
- iv) 30 sekund w temperaturze 72 °C (wydłużanie kopii)
- 1 cykl: v) 10 minut w temperaturze 72 °C (końcowe wydłużanie)
- vi) trzymać w temperaturze 4 °C.

Uwaga: Program ten został zoptymalizowany do stosowania z termocyklerem Perkin Elmer 9600. Przy używaniu z innymi modelami konieczna może okazać się zmiana czasu trwania etapów cykli ii), iii) oraz iv).

1.4. Analiza ampliconu przy użyciu enzymów restrykcyjnych

Produkty PCR namnożone z DNA *R. solanacearum* wytwarzają odmienny polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych z enzymem *Ava* II po inkubacji w temperaturze 37 °C.

2. Protokół PCR wg Pastrik i Maiss (2000)

2.1. Primery oligonukleotydowe

Primer przedni Ps-1 5'-agt cga acg gca gcg ggg g-3'

Primer tylny Ps-2 5'-ggg gat ttc aca tcg gtc ttg ca-3'

Oczekiwany rozmiar amplikonu z *R. solanacearum* matrycy DNA = 553 bp.

2.2. Mieszanina reakcji PCR

Odczynnik	Ilość przypadająca na reakcję	Stężenie końcowe
Sterylna woda ultra czysta (UPW)	16,025 µl	
10X PCR bufor (1)	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (frakcja V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
Mieszania d-nTP (20mM)	0,125 µl	0,1 mM
Starter Ps-1 (10µM)	0,5 µl	0,2 µM
Starter Ps-2 (10µM)	0,5 µl	0,2 µM
Polimeraza Taq (5U/µl) (1)	0,1 µl	0,5 U
Objętość próby	5,0 µl	
Objętość całkowita:	25,0 µl	

(1) Metoda została zatwierdzona przy użyciu polimerazy Taq od Perkin Elmer (AmpliTaq) i Gibco BRL.

Uwaga: Pierwotnie zoptymalizowano dla termocyklera MJ Research PTC 200 z Gibco Taq Polymerase.

Perkin Elmer AmpliTaq i bufor można również wykorzystać w tych samych stężeniach.

2.3. Warunki reakcji PCR

Przeprowadzić następujący program:

- 1 cykl: i) 5 minuty w temperaturze 95 °C: (denaturacja matrycy DNA)
- 35 cykli: ii) 30 sekund w temperaturze 95 °C (denaturacja matrycy DNA)
- iii) 30 sekund w temperaturze 68 °C (dołączanie primerów)
- iv) 45 sekund w temperaturze 72 °C (wydłużanie kopii)
- 1 cykl: v) 5 minut w temperaturze 72 °C (końcowe wydłużanie)
- vi) trzymać w temperaturze 4 °C.

Uwaga: Program ten został zoptymalizowany do stosowania z termocyklerem MJ Research PTC 200. Przy używaniu z innymi modelami konieczna może okazać się zmiana czasu trwania etapów cykli ii), iii) oraz iv).

2.4. Analiza amplikonu przy użyciu enzymów restrykcyjnych

Produkty PCR namnożone z DNA *R. solanacearum* wytwarzają odmienny polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych uzyskanych za pomocą enzymu Taq I po inkubacji w temperaturze 65 °C przez 30 minut. Fragmenty restrykcyjne uzyskane z *R. solanacearum* mają wielkość 457 bp oraz 96 bp.

3. Protokół testu multipleks PCR z kontrolą wewnętrzną PCR (Pastrik et al., 2002)

3.1. Primery oligonukleotydowe

Starter forward RS-1-F 5'-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3'

Starter reverse RS-1-R 5'-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3'

Starter forward NS-5-F 5'-AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G-3'

Starter reverse NS-6-R 5'-GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC-3'

Oczekiwany rozmiar amplikonu z *R. solanacearum* matrycy DNA = 718 bp (zestaw RS primer).

Oczekiwany rozmiar amplikonu z 18S rRNA z wewnętrzną kontrolą PCR = 310 bp (zestaw NS primer).

3.2. Mieszanina reakcji PCR

Odczynnik	Ilość przypadająca na reakcję	Stężenie końcowe
Sterylna woda ultra czysta (UPW)	12,625 µl	
10X PCR bufor ⁽¹⁾ (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (frakcja V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
Mieszania d-nTP (20mM)	0,125 µl	0,1 mM
Starter RS-1-F(10µM)	2,0 µl	0,8 µM
Starter RS-1-R(10µM)	2,0 µl	0,8 µM
Starter NS-5-F (10µM) ⁽²⁾	0,15 µl	0,06 µM
Starter NS-6-R (10µM) ⁽²⁾	0,15 µl	0,06 µM
Polimeraza Taq (5U/µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1,0 U
Objętość próby	5,0 µl	
Objętość całkowita	25,0 µl	

⁽¹⁾ Metoda została zatwierdzona przy użyciu polimerazy Taq od Perkin Elmer (AmpliTaq) i Gibco BRL.

⁽²⁾ Stężenie primerów NS-5-F oraz NS-6-R zoptymalizowano do ekstrakcji części przystolonowych przy pomocy metody homogenizacji i oczyszczania DNA według Pastrik (2000) (Patrz: sekcja VI.A.6.1.a). Ponowna optymalizacja stężeń odczynnika będzie wymagana, jeśli zostanie użyta metoda ekstrakcji przez wstrząsanie lub inna metoda izolacji DNA.

3.3. Warunki reakcji PCR

Przeprowadzić następujący program:

- 1 cykl: i) 5 minuty w temperaturze 95 °C: (denaturacja matrycy DNA)
- 35 cykli: ii) 30 sekund w temperaturze 95 °C (denaturacja matrycy DNA)
- iii) 30 sekund w temperaturze 58 °C (dołączanie primerów)
- iv) 45 sekund w temperaturze 72 °C (wydłużanie kopii)
- 1 cykl: v) 5 minut w temperaturze 72 °C (końcowe wydłużanie)
- vi) trzymać w temperaturze 4 °C.

Uwaga: Program ten został zoptymalizowany do stosowania z termocyklerem MJ Research PTC 200. Przy używaniu z innymi modelami, konieczna może okazać się zmiana czasu trwania etapów cykli ii), iii) oraz iv).

3.4. Analiza ampliconu przy użyciu enzymów restrykcyjnych

Produkty PCR namnożone z DNA *R. solanacearum* wytwarzają odmienny polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych z enzymem *Bsm* I lub *Isoschizomere* (np. *Mva* 1269 I) po inkubacji w temperaturze 65 °C przez 30 minut.

4. Protokół testu PCR specyficzny dla biowaru *R. solanacearum* (Pastrik *et al.*, 2001)

4.1. Primery oligonukleotydowe

Starter forward Rs-1-F	5'-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3'
Starter reverse Rs-1-R	5'-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3'
Starter reverse Rs-3-R	5'-TTC ACG GCA AGA TCG CTC-3'

Oczekiwany rozmiar ampliconu z *R. solanacearum* matrycy DNA:

z Rs-1-F/Rs-1-R = 718 bp

z Rs-1-F/Rs-3-R = 716 bp.

4.2. Mieszanina reakcji PCR

a) Biowar 1/2 specyficzny dla PCR

Odczynnik	Ilość przypadająca na reakcję	Stężenie końcowe
Sterylna woda ultra czysta (UPW)	12,925 µl	
10X PCR bufor ⁽¹⁾	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (frakcja V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
Mieszania d-NTP (20mM)	0,125 µl	0,1 mM
Starter Rs-1-F (10µM)	2 µl	0,8 µM
Starter Rs-1-R (10µM)	2 µl	0,8 µM
Polimeraza Taq (5U/µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1 U
Objętość próby	5,0 µl	
Objętość całkowita:	25,0 µl	

⁽¹⁾ Metoda została zatwierdzona przy użyciu polimerazy Taq z Perkin Elmer (AmpliTaq) i Gibco BRL.

b) PCR specyficzny dla biowaru 3/4/5

Odczynnik	Ilość przypadająca na reakcję	Stężenie końcowe
Sterylna woda ultra czysta (UPW)	14,925 µl	
10X PCR bufor ⁽¹⁾	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (frakcja V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
Mieszania dNTP (20mM)	0,125 µl	0,1 mM
Starter Rs-1-F (10µM)	1 µl	0,4 µM
Starter Rs-3-R (10µM)	1 µl	0,4 µM
Polimeraza Taq (5U/µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1 U
Objętość próby	5,0 µl	
Objętość całkowita	25,0 µl	

⁽¹⁾ Metoda została zatwierdzona przy użyciu polimerazy Taq z Perkin Elmer (AmpliTaq) i Gibco BRL.

4.3. Warunki reakcji PCR

Przeprowadzić następujący program dla reakcji specyficznej dla biowaru 1/2 i biowaru 3/4/5:

- 1 cykl: i) 5 minut w temperaturze 95 °C: (denaturacja matrycy DNA)
- 35 cykli: ii) 30 sekund w temperaturze 95 °C (denaturacja matrycy DNA)
- iii) 30 sekund w temperaturze 58 °C (dołączanie primerów)
- iv) 45 sekund w temperaturze 72 °C (wydłużanie kopii)
- 1 cykl: v) 5 minut w temperaturze 72 °C (końcowe wydłużanie)
- vi) trzymać w temperaturze 4 °C.

Uwaga: Program ten został zoptymalizowany do stosowania z termocyklerem MJ Research PTC 200. Przy używaniu z innymi modelami, konieczna może okazać się zmiana czasu trwania etapów cykli ii), iii) oraz iv).

4.4. Analiza ampliconu przy użyciu enzymów restrykcyjnych

Produkty PCR namnożone z DNA *R. solanacearum* przy użyciu primerów Rs-1-F oraz Rs-1-R wytwarzają odmienny polimorfizm długości fragmentu z enzymem *Bsm I* lub *Isoschizomere* (np. *Mva 1269 I*) po inkubacji w temperaturze 65 °C przez 30 minut. Produkty PCR namnożone z DNA *R. solanacearum* przy pomocy primerów Rs-1-F oraz Rs-3-R nie posiadają miejsc restrykcji.

5. Przygotowanie buforu obciążającego**5.1. Błękit bromofenolowy (roztwór 10 %)**

Błękit bromofenolowy	5 g
Woda destylowana (bidest)	50 ml

5.2. Bufor obciążający

Gliceryna (86 %)	3,5 ml
Błękit bromofenolowy (5,1)	300 µl
Woda destylowana (bidest)	6,2 ml

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

Bufor Tris	48,40 g
Kwas octowy lodowaty	11,42 ml
EDTA (sól dwusodowa)	3,72 g
Woda destylowana	1,00 l

Przed użyciem rozcieńczyć 1X.

Wszystkie dostępne w handlu (np. Invitrogen lub równoważne).

Dodatek 7

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

Sonda specyficzna dla *R. solanacearum* OLI-1-CY3: 5'-ggc agg tag caa gct acc ccc-3'

Sonda niespecyficzna eubakteryjna EUB-338-FITC: 5'-gct gcc tcc cgt agg agt-3'

2. Roztwór utrwalający

[UWAGA! UTRWALACZ ZAWIERA TOKSYCZNY PARAFORMALDEHYD. NALEŻY NOSIĆ RĘKAWICE I NIE WDYCHAĆ. ZALECA SIĘ PRACĘ W DYGESTORIUM]

- i) Ogrzać 9 ml wody o stopniu molekularnym (np. Ultra czysta woda (UPW)) do około 60 °C i dodać 0,4 g paraformaldehydu. Paraformaldehyd rozpuszcza się po dodaniu 5 kropli 1N NaOH i wymieszaniu na mieszadło magnetycznym.
- ii) Ustawić pH na 7,0 dodając 1 ml 0,1M buforu fosforanowego (PB; pH 7,0) i 5 kropli 1N HCl. Sprawdzić pH papierkiem lakmusowym i dostosować jeśli zachodzi taka potrzeba przy pomocy HCl lub NaOH. [UWAGA! NIE UŻYWAĆ PH-METRU W ROZTWORACH Z PARAFORMALDEHYDEM]
- iii) Przefiltrować roztwór przez filtr membranowy 0,22 µm i przechowywać do czasu użycia w temperaturze 4 °C, zabezpieczony przed kurzem.

3. 3X Hybmix

NaCl	2,7 M
Tris-HCl	60 mM (pH 7,4)
EDTA (sterylizowany na filtrze i autoklawowany)	15 mM

W miarę potrzeby rozcieńczyć do 1X.

4. Roztwór do hybrydyzacji

1X Hybmix

Siarczan dodecyłu sodu (SDS)	0,01 %
Formamid	30 %
Sonda EUB 338	5 ng/µl
Sonda OLI-1 lub OLI-2	5 ng/µl

Przygotować ilości roztworu do hybrydyzacji według obliczeń w tabeli 1. Dla każdego szkiełka (zawierającego 2 różne próby w powtórzeniu) wymagane jest 90 µl roztworu do hybrydyzacji. UWAGA: FORMAMID JEST BARDZO TOKSYCZNY, DLATEGO NALEŻY NOSIĆ RĘKAWICE I ZASTOSOWAĆ WŁAŚCIWE ŚRODKI BEZPIECZEŃSTWA!

Tabela 1 Sugerowane ilości przygotowania mieszaniny do hybrydyzacji

Liczba szkiełek	1	4	6	8	10
Sterylna woda ultra czysta (UPW)	23,1	92,4	138,6	184,8	231,0
3x Hybmix	30,0	120,0	180,0	240,0	300,0
1 % SDS	0,9	3,6	5,4	7,2	9,0
Formamid	27,0	108,0	162,0	216,0	270,0
Sonda EUB 338 (100 ng/µl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Sonda OLI-1 lub OLI-2 (100 ng/µl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Całkowita objętość (µl)	90,0	360,0	540,0	720,0	900,0

Uwaga: Przechowywać wszystkie roztwory zawierające wrażliwe na światło sondy oligonukleotydowe w ciemności, w temperaturze -20 °C.

Chronić przed bezpośrednim padaniem promieni słonecznych lub światła elektrycznego.

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

Na ₂ HPO ₄	8,52 g
KH ₂ PO ₄	5,44 g
Woda destylowana	1,00 l

Rozpuścić składniki, sprawdzić wartość pH i wysterylizować przy użyciu autoklawu w temperaturze 121 °C przez 15 min.

Dodatek 8

Hodowla roślin oberżyny i pomidora

Wysiać nasiona pomidora (*Lycopersicon esculentum*) lub oberżyny (*Solanum melongena*) do pasteryzowanego kompostu stosowanego do nasion. Siewki z pełni rozwiniętymi liśćciami (od 10 do 14 dni) przesadzić do pasteryzowanego kompostu doniczkowego.

Przed inokulacją, rośliny oberżyny lub pomidorów powinno hodować się w szklarni w następujących warunkach środowiskowych:

Długość dnia:	14 godzin lub naturalna długość dnia, w przypadku dnia dłuższego
Temperatura:	dzień: 21 do 24 °C, noc: 14 do 18 °C.
Wrażliwa odmiana pomidora:	»Moneymaker«
Wrażliwa odmiana oberżyny:	»Black Beauty«
Dostawcy:	patrz: strona internetowa http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

LITERATURA

1. Amann, R.I., L. Krumholz and D.A. Stahl. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172: 762-770.
2. Anon. 1998. Council Directive 98/57/EC of 20 July 1998 on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* Official Journal of the European Communities L235, 1-39.
3. Boudazin, G., A.C. Le Roux, K. Josi, P. Labarre and B. Jouan. 1999. Design of division specific primers of *Ralstonia solanacearum* and application to the identification of European isolates. *European Journal of Plant Pathology* 105; 373-380.
4. Caruso, P., Gorris, M.T., Cambra, M., Palomo, J.L., Collar, J and Lopez, M.M. 2002. Enrichment Double-Antibody Sandwich Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay That Uses a Specific Monoclonal Antibody for sensitive Detection of *Ralstonia solanacearum* in Asymptomatic Potato Tubers. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3634-3638.
5. Cook, D., Barlow, E. and Sequeira, L. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 1:113-121.
6. Elphinstone, J.G., Hennessy, J., Wilson, J.K. and Stead, D.E. 1996. Sensitivity of detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. *EPPO Bulletin* 26; 663-678.
7. Englebrecht, M.C. (1994) Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. In: A.C. Hayward (ed.) *Bacterial Wilt Newsletter* 10, 3-5. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.
8. Hayward, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 27; 265-277.
9. Hayward, A.C., El-Nashaar, H.M., Nydegger, U. and De Lindo, L. 1990. Variation in nitrate metabolism in biovars of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 69; 269-280.
10. Ito, S., Y. Ushijima, T. Fujii, S. Tanaka, M. Kameya-Iwaki, S. Yoshiwara and F. Kishi. 1998. Detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in soil using a semi-selective medium and a PCR technique. *J. Phytopathology* 146; 379-384.
11. Janse, J.D. (1988) A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 18, 343-351.
12. Janse, J.D. 1991. Infra- and intra-specific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty-acid analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 14; 335-345.
13. Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44; 693-695.
14. Klement Z.; Rudolph, K and D.C. Sands, 1990. *Methods in Phytobacteriology*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 pp.
15. Lelliott, R.A. and Stead, D.E. 1987. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. Blackwell scientific Publications Ltd., Oxford. 216 pp.
16. Lopez, M.M., Gorris, M.T., Llop, P., Cubero, J., Vicedo, B., Cambra, M., 1997. Selective enrichment improves selective isolation, serological and molecular detection of plant pathogenic bacteria. In: H.W. Dehne *et al.*, (eds). *Klewer Academic Publishers*. pp. 117-121.
17. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J., 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2286-2295.
18. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85; 528-536.
19. Opina, N., F. Tavner, G. Holloway, J.-F. Wang, T.-H. Li, R. Maghirang, M. Fegan, A.C. Hayward, V. Krishnapillai, W.F. Hong, B.W. Holloway, J.N. Timmis. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *As Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 5; 19-33.
20. Pstrik, K.H. and Maiss, E. 2000. Detection of *R. solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. *J. Phytopathology* 148; 619-626.
21. Pstrik, K.H., Elphinstone, J.G. and Pukall, R. 2002. Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification of 16S-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control. *European Journal of Plant Pathology* 108, 831-842.
22. Robinson-Smith, A., Jones, P., Elphinstone, J.G. and Forde, S.M.D. (1995) Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. *Food and Agricultural Immunology* 7, 67-79.

23. Schaad, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Schaad [Hrsg.]. - 3. ed.; St. Paul, Minnesota: 373 pp.
 24. Seal, S.E., L.A. Jackson, J.P.W. Young, and M.J. Daniels. 1993. Detection of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. J. Gen. Microbiol. 139: 1587-1594.
 25. Smith, J.J., Offord, L.C., Holderness, M. and Saddler, G.S. 1995. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. Applied and Environmental Microbiology 61; 4262-4268.
 26. Stead, D.E. 1992. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty-acid profiles. International Journal of Systematic Bacteriology 42; 281-295.
 27. Taghavi, M., Hayward, A.C., Sly, L.I., Fegan, M. 1996. Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. International Journal of Systematic Bacteriology 46; 10-15.
 28. Van Der Wolf, J.M., Bonants, P.J.M., Smith, J.J., Hagenaar, M., Nijhuis, E., Van Beckhoven, J.R.C., Saddler, G.S., Trigallet, A., Feuillade, R. 1998. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* Race 3 in Western Europe as determined by AFLP, RC-PFGE and rep-PCR. In: Prior, P., Allen, C. and Elphinstone, J. (eds.) Bacterial wilt disease: Molecular and Ecological Aspects. Springer (Berlin) pp. 44-49.
 29. Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N., Stead, D.E. and Boonham, N. 1999. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains using an automated and quantitative fluorescent 5' nuclease TaqMan assay. Applied and Environmental Microbiology 66; 2853-2858.
 30. Wullings, B.A., A.R. van Beuningen, J.D. Janse and A.D.L. Akkermans. 1998. Detection of *R. solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent in situ hybridization with 23S rRNA-targeted probes. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4546-4554.
-

ZAŁĄCZNIK III

1. We wszystkich przypadkach podejrzenia wystąpienia organizmu, gdy uzyskano pozytywny wynik badania przesiewowego dla wyszczególnionego materiału roślinnego i dla innych przypadków, stosując właściwą metodę określoną w załączniku II, gdy oczekuje się na potwierdzenie lub wykluczenie wyniku po zakończeniu stosowanych badań, należy we właściwy sposób zachować i zabezpieczyć:

- wszystkie próby bulw oraz, gdy tylko jest to możliwe, wszystkie próby roślin,
- wszelkie pozostałe ekstrakty oraz przygotowany do badań przesiewowych materiał, np. szkiełka do immunofluorescencji, oraz
wszelkie stosowne dokumenty
- aż do zakończenia opisywanych badań.

Zatrzymanie bulw umożliwi wykonanie różnorodnych badań, w razie wystąpienia takiej potrzeby.

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

- materiał wyszczególniony w pkt. 1,
oraz
 - próbę zainfekowanego materiału z pomidora lub oierzyny zainokulowanej ekstraktem z bulwy lub rośliny, tam gdzie stosowne, a także
kulturę wyizolowanego organizmu.
 - przez co najmniej jeden miesiąc po procedurze powiadomienia, zgodnie z art. 5 ust. 2.
-

ZAŁĄCZNIK IV

Elementy składające się na postępowanie, do których odnosi się art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt i) obejmują odpowiednio:

i) miejsca produkcji:

- gdzie są lub były uprawiane rośliny ziemniaka, które są klonalnie spokrewnione z roślinami ziemniaka porażonymi przez organizm,
- gdzie są lub były uprawiane rośliny pomidora, które pochodzą z tego samego źródła, co rośliny pomidora porażone przez organizm,
- gdzie są lub były uprawiane rośliny ziemniaka lub pomidora, które zostały objęte urzędową kontrolą w związku z podejrzeniem wystąpienia organizmu,
- gdzie są lub były uprawiane rośliny ziemniaka, które są klonalnie spokrewnione z roślinami ziemniaka rosnącymi w miejscach produkcji porażonych organizmem,
- gdzie są uprawiane rośliny ziemniaka lub pomidora, zlokalizowane w pobliżu porażonych miejsc produkcji, łącznie z takimi miejscami produkcji, w których wspólnie był lub jest, bezpośrednio lub pośrednio, użytkowany sprzęt lub urządzenia,
- w których stosuje się do nawadniania lub opryskiwania wody powierzchniowe ze źródła, o którym wiadomo lub podejrzewa się, że zostało skażone organizmem,
- w których wykorzystuje się te same wody powierzchniowe do nawadniania lub opryskiwania, co w porażonych lub podejrzanych o porażenie organizmem miejscach produkcji,
- które są lub były zalewane wodami powierzchniowymi, o których wiadomo, lub podejrzewa się, że zostały skażone organizmem;

oraz

ii) wody powierzchniowe, stosowane do nawadniania lub opryskiwania, lub takie wody, które zalewają pole(-a) lub miejsce(-a) produkcji, o których wiadomo, że zostały porażone organizmem.

—

ZAŁĄCZNIK V

1. Elementy brane pod uwagę w celu określenia zasięgu prawdopodobnego porażenia, na mocy art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt iii) oraz 5 ust. 1 lit. c) ppkt iii), obejmują:
 - wyszczególniony materiał roślinny rosnący w miejscu produkcji, uznanym za porażone na mocy art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt ii),
 - miejsce(-a) produkcji związane w jakikolwiek sposób z produkcją wyszczególnionego materiału roślinnego, uznanego za porażony, na mocy art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt ii), łącznie z tymi miejscami, w których wspólnie był lub jest, bezpośrednio lub pośrednio, użytkowany sprzęt lub urządzenia,
 - wyszczególniony materiał roślinny, wytworzony w miejscu(-ach) produkcji, do których odnosi się poprzednie tiret, lub obecny w takim miejscu(ach) produkcji, w okresie, gdy wyszczególniony materiał roślinny, uznany za porażony na mocy art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt ii), był obecny w miejscu produkcji, do którego odnosi się tiret pierwsze,
 - miejsca, w których znajdował się wyszczególniony materiał roślinny, pochodzący z miejsc produkcji omawianych w powyższych tirket,
 - wszelkie maszyny, urządzenia, sprzęt, pojazdy, pojemniki, magazyny, lub ich części, a także wszelkie inne przedmioty, łącznie z materiałami używanymi do pakowania, które mogły mieć kontakt z wyszczególnionym materiałem roślinnym uznanym za porażony, na mocy art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt ii),
 - cały wyszczególniony materiał roślinny, przechowywany, lub będący w kontakcie, z wszelkimi obiektami lub przedmiotami, wyszczególnionymi w poprzednim tirket, przed ich oczyszczeniem i zdezynfekowaniem,
 - w wyniku postępowania i badań, na mocy art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt i), w przypadku ziemniaka, bulwy lub rośliny pochodzące z tego samego rozmnożenia klonalnego (powiązane siostrzanie lub matecznie), a w przypadku pomidora, rośliny pochodzące z tego samego źródła, co wyszczególniony materiał roślinny, uznany za porażony na mocy art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt ii), i w przypadku którego istnieje prawdopodobieństwo porażenia ze względu na pokrewieństwo klonalne, pomimo uzyskania negatywnych wyników badań. Celem identyfikacji porażonych i klonalnie spokrewnionych bulw lub roślin, można zastosować testowanie odmian,
 - miejsce(-a) produkcji wyszczególnionego materiału roślinnego, przedstawione w poprzednim tirket,
 - miejsce(-a) produkcji wyszczególnionego materiału roślinnego, w którym stosuje się do nawadniania lub opryskiwania wodę, która została uznana za skażoną, na mocy art. 5 ust. 1 lit. c) ppkt ii),
 - wyszczególniony materiał roślinny, produkowany na polach zalewanych wodami powierzchniowymi, uznanymi za skażone.
2. Elementy brane pod uwagę w celu ustalenia zasięgu możliwego rozprzestrzenienia się organizmu, na mocy art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt iv) oraz art. 5 ust. 1 lit. c) ppkt iii) obejmują:
 - i) w przypadkach objętych art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt iv):
 - bliskość innych miejsc produkcji wyszczególnionego materiału roślinnego,
 - wspólną produkcję i używanie tego samego materiału wyjściowego sadzeniaka ziemniaka,
 - miejsca produkcji, w których wykorzystuje się wody powierzchniowe do nawadniania lub opryskiwania wyszczególnionego materiału roślinnego, w przypadkach, gdy istnieje ryzyko, że wody te spłynęły, lub zalewały miejsca(-ch) produkcji, uznane za porażone na mocy art. 5 ust. 1 lit. a) punkt ii).

- ii) w przypadkach gdy wody powierzchniowe zostały uznane za skażone, na mocy art. 5 ust. 1 lit. c) ppkt ii):
- miejsce(-a) produkcji wyszczególnionego materiału roślinnego, sąsiadujące lub narażone na ryzyko zalanania przez wody powierzchniowe uznane za skażone,
 - dowolne, oddzielnie umiejscowione zbiorniki nawadniające, łączące się z wodą uznaną za skażoną,
 - jakikolwiek odosobniony zbiornik irygacyjny połączony z wodami powierzchniowymi uznanymi za skażone, z uwzględnieniem:
 - kierunku i natężenia przepływu wody uznanej za skażoną,
 - obecności dzikich żywicielskich roślin z rodziny psiankowatych.

3. Informacje zawarte w powiadomieniu, wskazanym w art. 5 ust. 2, obejmują:

- natychmiast po potwierdzeniu obecności organizmu na podstawie badania laboratoryjnego, przy wykorzystaniu metod określonych w załączniku II, przynajmniej:
 - dla ziemniaków:
 - a) nazwę odmiany dla każdej partii;
 - b) typ (sadzeniaki, ziemniaki inne niż sadzeniaki, itp.) oraz, tam, gdzie właściwe, kategorię dla sadzенок ziemniaka,
 - dla roślin pomidorów – nazwę odmiany dla każdej partii oraz, tam gdzie właściwe, kategorię,
- bez uszczerbku dla wymogów odnośnie powiadamiania o podejrzanym wystąpieniu w art. 4 ust. 3, państwo członkowskie, w którym potwierdzono występowanie, w sytuacji, w której istnieje ryzyko porażenia objętego wykazem materiału roślinnego z innego lub w innym państwie członkowskim, natychmiast przekaże zainteresowanemu państwu członkowskiemu informacje konieczne dla zapewnienia zgodności z art. 5 ust. 3, takie jak:
 - a) nazwa odmiany partii ziemniaka lub pomidora;
 - b) nazwa i adres wysyłającego i odbiorcy;
 - c) data dostawy partii ziemniaków lub pomidorów;
 - d) wielkość dostarczonej partii ziemniaków lub pomidorów;
 - e) kopia paszportu roślin lub przynajmniej jego numer, tam gdzie ma to zastosowanie, lub, tam gdzie ma to zastosowanie, numer rejestracyjny producenta lub handlowca i kopia dokumentu dostawczego.

Komisja zostanie natychmiast powiadomiona o dostarczeniu takich informacji.

4. Szczegółowe informacje zawarte w dodatkowym powiadomieniu, przedstawionym w art. 5 ust. 2 akapit drugi, obejmują:

po zakończeniu postępowania, dla każdego przypadku:

- a) datę potwierdzenia porażenia;
- b) krótki opis postępowania prowadzonego w celu określenia źródła i zasięgu możliwego rozprzestrzenienia się porażenia, łącznie z informacją o poziomie próbobrania;
- c) informacje na temat rozpoznanych lub podejrzanym źródeł(-a) porażenia;
- d) szczegółowe informacje na temat określonego zasięgu porażenia, wraz z liczbą miejsc produkcji, a w przypadku ziemniaków liczbą partii ze wskazaniem odmiany oraz, w przypadku sadzенок, kategorii;

- e) szczegółowe informacje na temat wyznaczonej strefy, wraz z liczbą miejsc produkcji, nieoznaczonych jako porażone, lecz znajdujących się w tej strefie;
 - f) szczegółowe informacje na temat wyznaczonych wód, wraz z nazwą i lokalizacją zbiornika wodnego i wyznaczonym zasięgiem/zakazem nawadniania;
 - g) w przypadku wszelkich przesyłek lub partii roślin pomidora uznanych za porażone – świadectwa zalecane w art. 13 ust. 1 ppkt ii) dyrektywy 2000/29/WE oraz numer paszportu, zgodnie z wykazem przedstawionym w załączniku V, część A sekcja I.2.2 do dyrektywy 2000/29/WE;
 - h) inne informacje dotyczące potwierdzonego przypadku wystąpienia, jakich może zażądać Komisja.
-

ZAŁĄCZNIK VI

1. Przepisy, o których mowa w art. 6 ust. 1, obejmują:

- zastosowanie jako pasza dla zwierząt po uprzedniej obróbce cieplnej, która zabezpieczy przed ryzykiem przeżycia organizmu,
lub
- złożenie na urzędowo zatwierdzonym specjalnym składowisku odpadów, gdzie nie istnieje możliwe do zidentyfikowania ryzyko przedostania się organizmu do środowiska np. poprzez przesączanie na użytki rolne lub kontakt ze źródłami wody, która mogłaby być wykorzystywana do nawadniania użytków rolnych,
lub
- spalanie,
lub
- przetwórstwo przemysłowe, poprzez bezpośrednie i natychmiastowe przesłanie do zakładu przetwórczego posiadającego urzędowo zaakceptowane urządzenia do utylizacji odpadów, dla których ustalono, że nie występuje możliwe do zidentyfikowania ryzyko rozprzestrzeniania się organizmu wraz z systemem oczyszczania i dezynfekcji przynajmniej pojazdów wyjeżdżających,
lub
- podjęcie innych środków, pod warunkiem, że nie niosą one ze sobą możliwego do zidentyfikowania ryzyka rozprzestrzeniania się organizmu; o tych środkach wraz z ich uzasadnieniem należy powiadamiać Komisję i pozostałe państwa członkowskie.

Jakiegokolwiek pozostałe odpady powstałe w wyniku wyżej opisanych procedur należy usuwać za pomocą urzędowo zatwierdzonych metod zgodnie z załącznikiem VII do niniejszej dyrektywy.

2. Właściwe wykorzystanie lub składowanie wyszczególnionego materiału roślinnego, o którym mowa w art. 6 ust. 2, pod kontrolą właściwych organów urzędowych danego(-ych) państwa(-w) członkowskiego(-ich), przy zapewnieniu właściwej komunikacji pomiędzy tymi organami w celu utrzymania stałego poziomu kontroli oraz przy akceptacji właściwych organów państwa członkowskiego, w którym ziemniaki są pakowane lub przetwarzane, w związku z wymienionymi w pierwszym i drugim tiret urządzeniami do usuwania odpadów, obejmuje:

i) w stosunku do bulw ziemniaka:

- wykorzystanie ich jako ziemniaki inne niż sadzeniaki przeznaczone do konsumpcji, pakowane jako gotowe do bezpośredniej dostawy i zastosowania bez przepakowywania w miejscach, w których są urządzenia przeznaczone do usuwania odpadów. Ziemniaki przeznaczone do sadzenia można przetwarzać lub przechowywać w tym samym miejscu tylko wówczas, jeśli odbywa się to w oddzieleniu lub po oczyszczeniu i dezynfekcji,
lub
- wykorzystanie ich jako ziemniaki inne niż sadzeniaki, przeznaczone do przetwórstwa przemysłowego oraz przeznaczone do bezpośredniej i natychmiastowej dostawy do zakładu przetwórczego, wyposażonego w odpowiednie urządzenia do usuwania odpadów oraz system oczyszczania i dezynfekcji przynajmniej pojazdów wyjeżdżających,
lub
- inne sposoby wykorzystania lub usunięcia, pod warunkiem że ustalono, iż nie istnieje możliwe do zidentyfikowania ryzyko rozprzestrzeniania się organizmu i po uzyskaniu akceptacji właściwych organów urzędowych;

ii) w odniesieniu do innych części roślin, łącznie z łodygą oraz resztkami liści:

- zniszczenie,
lub
- inny sposób wykorzystania lub usunięcia, pod warunkiem że nie niesie on ze sobą możliwego do zidentyfikowania ryzyka rozprzestrzeniania się organizmu; oraz po uzyskaniu akceptacji wyżej wymienionych właściwych organów urzędowych.

3. Właściwymi metodami odkażania przedmiotów lub obiektów, określonych w art. 6 ust. 3, jest oczyszczanie oraz – w przypadkach uzasadnionych – dezynfekcja, tak aby nie powstało możliwe do zidentyfikowania ryzyko rozprzestrzenienia się organizmu. Metody te należy stosować pod nadzorem właściwych organów rządowych państw członkowskich.
4. Szereg środków, które państwa członkowskie wprowadzą w wyznaczonej strefie(-ach), na mocy art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt iv) oraz art. 5 ust. 1 lit. c) ppkt iii), określonych w art. 6 ust. 4, obejmuje:
 - 4.1. W miejscach produkcji uznanych za porażone, na mocy art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt ii):
 - a) na polu lub w miejscu uprawy pod osłonami, które na mocy art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt ii) zostało oznaczone jako porażone, albo:
 - i) w ciągu co najmniej czterech lat uprawy, następujących po stwierdzeniu porażenia,
 - podjęte zostaną środki, prowadzące do wyeliminowania samosiewów ziemniaka oraz pomidora, a także innych roślin żywicielskich dla organizmu, łącznie z chwastami z rodziny psiankowatych,
 - oraz
 - zakazuje się sadzenia:
 - bulw, roślin i nasion ziemniaka,
 - roślin i nasion pomidora,
 - uwzględniając biologię organizmu,
 - innych roślin żywicielskich,
 - roślin z rodzaju *Brassica*, w stosunku do których istnieje zidentyfikowane ryzyko przetrwania tego organizmu.
 - innych roślin, dla których istnieje możliwe do zidentyfikowania ryzyko rozprzestrzenienia się organizmu,
 - w pierwszym sezonie uprawy ziemniaka lub pomidora, następującym po okresie opisanym w poprzednim tiret, jeżeli sprawdzono w czasie rządowych kontroli, że na polu nie ma ani samosiewów ziemniaka lub pomidora, ani innych roślin żywicielskich organizmu, łącznie z chwastami z rodziny psiankowatych, przez dwa kolejne lata uprawy przed sadzeniem,
 - w przypadku ziemniaka zezwala się na produkcję jedynie ziemniaków innych niż sadzeniaki,
 - w przypadku ziemniaka i pomidora, zebrane bulwy ziemniaka lub rośliny pomidora, w odpowiednich przypadkach są badane zgodnie z procedurą opisaną w załączniku II;
 - w sezonie uprawy ziemniaka lub pomidora, następującym bezpośrednio po sezonie, o którym mowa w poprzednim tiret, oraz po zastosowaniu właściwego zmianowania, które obejmuje co najmniej dwa lata, jeśli mają być uprawiane sadzeniaki ziemniaka, przeprowadza się rządową kontrolę zgodnie z art. 2 ust. 1;
 - albo
 - ii) podczas pięciu lat uprawy następujących po stwierdzeniu porażenia:
 - powinny być podejmowane działania, zmierzające do eliminacji samosiewów ziemniaka oraz pomidora i innych naturalnie występujących roślin żywicielskich organizmu, łącznie z chwastami z rodziny psiankowatych,
 - oraz
 - pole w ciągu pierwszych trzech lat należy: albo pozostawić odłogiem, albo uprawiać na nim zboża w zależności od ocenionego stopnia ryzyka, albo przeznaczyć na stałe pastwisko stosując częste niskie koszenie lub intensywny wypas, albo przeznaczyć na produkcję nasienną traw, po czym przez kolejne dwa lata uprawiać tam rośliny niebędące żywicielami organizmu i niestwarzające możliwości do zidentyfikowania ryzyka przetrwania lub rozprzestrzenienia się tego organizmu,

- w pierwszym sezonie uprawy ziemniaka lub pomidora, następującym po okresie opisanym w poprzednim tiret, jeżeli sprawdzono w czasie urzędowych kontroli, że na polu nie ma ani samosiewów ziemniaka lub pomidora, ani innych roślin żywicielskich organizmu, łącznie z chwastami z rodziny psiankowatych, przez dwa kolejne lata uprawy przed sadzeniem:
 - w przypadku ziemniaków dopuszcza się uprawę sadzeniaków ziemniaka lub innych ziemniaków,
 - zbierane bulwy ziemniaka lub rośliny pomidora są badane zgodnie z procedurą opisaną w załączniku II;
- b) na wszystkich pozostałych polach porażonego miejsca produkcji, pod warunkiem że właściwe organy urzędowe mają pewność, że wyeliminowane zostało ryzyko występowania samosiewów ziemniaków lub pomidorów i innych naturalnie występujących roślin żywicielskich organizmu łącznie z chwastami z rodziny psiankowatych:
 - w roku uprawy następującym bezpośrednio po roku, w którym stwierdzono porażenie:
 - nie uprawia się bulw, roślin ani nasion ziemniaka lub innych roślin żywicielskich organizmu,
lub
 - w odniesieniu do bulw ziemniaka, sadi się wyłącznie urzędowo kwalifikowane sadzeniaki ziemniaka, przeznaczone na ziemniaki inne niż sadzeniaki,
 - w przypadku roślin pomidora mogą być uprawiane tylko rośliny pomidora uzyskane z nasion, które spełniają wymogi dyrektywy 2000/29/WE, z przeznaczeniem na produkcję owoców,
 - w drugim roku uprawy następującym po roku, w którym stwierdzono porażenie:
 - w odniesieniu do ziemniaków, można sadzić wyłącznie urzędowo kwalifikowane sadzeniaki ziemniaka lub ziemniaki urzędowo przebadane pod kątem występowania organizmu, które były uprawiane pod kontrolą urzędową w miejscach produkcji inne niż te, o których mowa w pkt 4.1, z przeznaczeniem na sadzeniaki lub ziemniaki inne niż sadzeniaki,
 - w przypadku pomidorów można sadzić wyłącznie rośliny uzyskane z nasion, które spełniają wymogi dyrektywy 2000/29/WE lub w przypadku roślin rozmnażanych wegetatywnie, z roślin uzyskanych z takich nasion i rosnących pod urzędową kontrolą w miejscach produkcji innych niż te, o których mowa w pkt 4.1, z przeznaczeniem na produkcję roślin lub owoców,
 - przynajmniej przez trzeci rok uprawy następujący po roku w którym stwierdzono porażenie:
 - w przypadku ziemniaków, można sadzić wyłącznie urzędowo kwalifikowane sadzeniaki ziemniaka lub ziemniaki, które były uprawiane pod urzędową kontrolą z urzędowo kwalifikowanych sadzeniaków ziemniaka, z przeznaczeniem na sadzeniaki lub ziemniaki inne niż sadzeniaki,
 - w przypadku pomidorów, można sadzić wyłącznie rośliny uzyskane z nasion spełniających wymogi dyrektywy 2000/29/WE lub rośliny uzyskane pod urzędową kontrolą z takich roślin, z przeznaczeniem na produkcję roślin lub owoców,
 - w każdym roku uprawy, o którym mowa w poprzednich tiret, podejmuje się środki w celu wyeliminowania samosiewnych roślin ziemniaka i innych naturalnie występujących roślin żywicielskich organizmu jeśli zostanie stwierdzona ich obecność, oraz przeprowadza się urzędową kontrolę uprawy w odpowiednim czasie, a w przypadku każdego pola ziemniaków zebrane bulwy są badane zgodnie z procedurą opisaną w załączniku II;
- c) niezwłocznie po stwierdzeniu porażenia, na mocy art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt ii), a także po pierwszym kolejnym roku uprawy:
 - wszelkie maszyny, urządzenia, sprzęt i miejsca przechowywania znajdujące się w miejscu produkcji oraz wykorzystywane do produkcji ziemniaka lub pomidora, są oczyszczone i w razie potrzeby, są poddawane dezynfekcji, przy użyciu właściwych metod, wyszczególnionych w ust. 3,
 - urzędowe kontrole programów nawadniania i opryskiwania, łącznie z zakazem tych czynności, zostaną wprowadzone jako zabezpieczenie przed rozprzestrzenieniem się organizmu;

d) w miejscach uprawy pod osłonami uznanych za porażone na mocy art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt ii), w przypadkach, w których możliwa jest całkowita wymiana podłoża uprawowego:

- nie sadi się bulw, roślin ani nasion ziemniaka, ani też nie uprawia się innych roślin żywicielskich organizmu, łącznie z roślinami i nasionami pomidora, dopóki dane miejsce nie zostanie poddane urzędowo uznanym środkom, prowadzącym do wyeliminowania organizmu i usunięcia pozostałości roślin żywicielskich, łącznie co najmniej z całkowitą wymianą podłoża uprawowego i oczyszczeniem, a w razie potrzeby, dezynfekcją tego miejsca oraz wszelkiego sprzętu, w wyniku czego właściwe organy urzędowe wyrażają zgodę na produkcję roślin ziemniaka lub pomidora,

oraz

- w przypadku produkcji ziemniaka odbywa się ona z wykorzystaniem urzędowo kwalifikowanego sadzeniaka ziemniaka, albo minibułw lub mikroroslin, pochodzących z przebadanych źródeł,
- w przypadku produkcji pomidorów odbywa się ona z wykorzystaniem roślin uzyskanych z nasion, które spełniają wymogi dyrektywy 2000/29/WE, lub w wypadku roślin rozmnażanych wegetatywnie z roślin pomidora uzyskanych z takich nasion i rosnących pod urzędową kontrolą,
- wprowadza się urzędowe kontrole programów nawadniania i opryskiwania, oraz – w razie potrzeby – ich zakaz, w celu zapobieżenia rozprzestrzenianiu się danego organizmu.

4.2. W obrębie wyznaczonej strefy, bez uszczerbku dla środków podjętych zgodnie z pkt 4.1, państwa członkowskie:

a) niezwłocznie po stwierdzeniu porażenia zapewniają oczyszczenie i dezynfekcję wszystkich maszyn, urządzeń, sprzętu i miejsc przechowywania związanych z produkcją ziemniaków lub pomidorów na takim terenie w odpowiedni sposób i przy użyciu właściwych metod zgodnie z pkt 3;

b) niezwłocznie i przez co najmniej trzy lata uprawy po stwierdzeniu porażenia:

ba) w przypadkach wyznaczenia strefy na mocy art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt iv):

- zapewniają nadzór, sprawowany przez właściwe organy urzędowe, miejsc produkcji, magazynowania, przeładunku lub innych miejsc związanych z bulwami ziemniaka lub pomidorami, łącznie z miejscami w których wspólnie użytkowane są maszyny, urządzenia, sprzęt do produkcji ziemniaka lub pomidora,
- wymagają sadzenia jedynie urzędowo kwalifikowanych sadzeniaków ziemniaka lub ziemniaków, uprawianych pod urzędową kontrolą w stosunku do wszystkich ziemniaków uprawianych w tej strefie, a także badania po zbiorze sadzeniaków uprawianych w miejscach produkcji określonych zgodnie z art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt iii) jako prawdopodobnie porażone,
- wymagają separowania czynności w jakikolwiek sposób związanych ze zbiorem, przechowywaniem, przemieszczaniem, pakowaniem zebranych sadzeniaków ziemniaka, od takich czynności wykonywanych przy ziemniakach innych niż sadzeniaki, na terenie wszystkich miejsc w obrębie strefy lub zapewnienia systemu oczyszczania i, gdzie to stosowne, dezynfekcji, pomiędzy sadzonymi ziemniakami i innymi niż sadzeniaki,
- wymagają, aby uprawiane były jedynie rośliny pomidora uzyskane z nasion, które spełniają wymogi dyrektywy 2000/29/WE, lub w przypadku roślin rozmnażanych wegetatywnie z roślin uzyskanych z takich nasion i rosnących pod urzędową kontrolą, we wszystkich uprawach pomidorów w strefie,
- przeprowadzają urzędowe kontrole, jak szczegółowo określono w art. 2 ust. 1;

bb) w przypadkach uznania wód powierzchniowych za skażone na mocy art. 5 ust. 1 lit. c) ppkt ii) lub za drogę możliwego rozprzestrzeniania się organizmu, zgodnie z załącznikiem V pkt 2:

- prowadzą coroczną kontrolę we właściwym czasie, łącznie z pobraniem prób wód powierzchniowych oraz w odpowiednich przypadkach roślin żywicielskich z rodziny psiankowatych, rosnących w sąsiedztwie tych wód, oraz wykonują badania zgodnie z właściwymi metodami wymienionymi w załączniku II dla wyszczególnionego materiału roślinnego i w innych przypadkach,

- przeprowadzają urzędowe kontrole programów nawadniania i opryskiwania, łącznie z zakazem stosowania wody uznanej za skażoną do nawadniania lub opryskiwania wyszczególnionego materiału roślinnego, oraz w miarę potrzeb, innych roślin żywicielskich, dla zapobieżenia rozprzestrzeniania się organizmu. Zakaz można zweryfikować na podstawie wyników wspomnianych wyżej corocznych kontroli, a uznanie skażenia może zostać zniesione, jeśli właściwe organy urzędowe uznają, że wody powierzchniowe nie są skażone. Użycie wody podlegającej zakazowi może być dozwolone, pod urzędowym nadzorem, dla nawadniania i opryskiwania roślin żywicielskich, przy wykorzystaniu urzędowo zatwierdzonych technik eliminowania organizmu i zapobiegania jego rozprzestrzenianiu,
 - w przypadkach stwierdzenia skażenia odpadów płynnych należy wprowadzić kontrole urzędowe usuwania odpadów stałych lub płynnych powstałych podczas przetwórstwa przemysłowego lub z miejsc pakowania, związanych z wyszczególnionym materiałem roślinnym,
- c) w miarę potrzeb ustanawiają program wymiany sadzeniaków ziemniaka w określonym czasie.
-

ZAŁĄCZNIK VII

Urzędowo zatwierdzone metody usuwania odpadów, określone w ust. 1 załącznika VI, są zgodne z następującymi przepisami, wykluczającymi możliwe do zidentyfikowania ryzyko rozprzestrzeniania się danego organizmu:

- i) stałe odpady z przetwórstwa przemysłowego ziemniaka oraz pomidora (łącznie z odrzuconymi ziemniakami i pomidorami oraz z obierzynami ziemniaków) oraz wszelkie inne stałe odpady związane z ziemniakami lub pomidorami (w tym gleba, kamienie i inne resztki), powinny być utylizowane następująco:
- składowane na urzędowo zatwierdzonym specjalnym składowisku odpadów, gdzie nie istnieje możliwe do zidentyfikowania ryzyko przedostania się organizmu do środowiska, np. poprzez przesączanie na użytki rolne lub kontakt ze źródłami wody, która mogłaby być używana do ich nawadniania. Odpady należy przewieźć bezpośrednio na składowisko w warunkach wykluczających ryzyko ich rozniesienia się,
- lub
- spalone,
- lub
- usunięte za pomocą innych środków, pod warunkiem, że nie niosą one ze sobą możliwego do zidentyfikowania ryzyka rozprzestrzeniania się organizmu; Komisja i inne państwa członkowskie muszą być powiadomione o takich środkach;
- ii) w odniesieniu do odpadów płynnych: przed ich utylizacją, odpady płynne zawierające zawieszono cząstki stałe należy poddać filtrowaniu lub procesowi osiadania w celu usunięcia tych cząstek. Cząstki te należy usuwać jak określono w ppkt i).

Następnie odpady płynne należy:

- podgrzewać w całej objętości do temperatury co najmniej 60 °C przez przynajmniej 30 minut przed ich usunięciem,
- lub
- za zgodą odpowiednich władz i pod urzędową kontrolą usunąć w taki sposób, by nie zaistniało możliwe do zidentyfikowania ryzyko, że odpady te wejdą w kontakt z glebą użytków rolnych lub ze źródłami wody, która mogłaby być użyta do ich nawadniania. Komisja i pozostałe państwa członkowskie są powiadamiane szczegółowo o przeprowadzonych działaniach.

Opcje opisane w niniejszym załączniku stosuje się również w odniesieniu do odpadów powstałych podczas przetwarzania, przewożenia lub usuwania porażonych partii.”
