

I

(Kötelezően közzéteendő jogi aktusok)

A BIZOTTSÁG 2006/56/EK IRÁNYELVE

(2006. június 12.)

a burgonya gyűrűs rothadása elleni védekezésről szóló 93/85/EGK tanácsi irányelv mellékleteinek módosításáról

AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK BIZOTTSÁGA,

tekintettel az Európai Közösséget létrehozó szerződésre,

tekintettel a burgonya gyűrűs rothadása elleni védekezésről szóló, 1993. október 4-i 93/85/EGK tanácsi irányelvre ⁽¹⁾ és különösen annak 12. cikkére,

mivel:

(1) A burgonya egyik fontos károsítója a *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis *et al.* ssp. *sepedonicus* (Spieckermann *et* Kotthoff) Davis *et al.*, a burgonya gyűrűs rothadás betegség kórokozója (a továbbiakban: a károsító).

(2) A károsító még mindig előfordul a Közösség egyes részein.

(3) A 93/85/EGK tanácsi irányelv meghatározta a tagállamokban a károsító ellen annak érdekében végrehajtandó részletes intézkedéseket, hogy lokalizálják és meghatározzák a földrajzi elterjedését; megelőzzék az előfordulását és a terjedését; valamint – előfordulása esetén – megakadályozzák a továbbterjedését és védekezzenek ellene a felszámolása céljából.

(4) Azóta jelentősen bővültek a károsító biológiájára, valamint kimutatási és azonosítási eljárásaira vonatkozó ismeretek; továbbá a károsító elleni védekezésben szerzett gyakorlati ismeretek szükségessé teszik több – a védekezési intézkedésekkel összefüggő – szakmai rendelkezés felülvizsgálatát.

(5) E fejlemények eredményeképpen szükségesnek látszik a 93/85/EGK irányelv mellékleteiben lévő intézkedések felülvizsgálata és naprakészé tétele.

(6) A kimutatási és azonosítási eljárások vonatkozásában a fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH), egy korszerű kimutatási módszer kerül beépítésre, valamint a jelenlegi kimutatási és azonosítási eljárás különböző szakmai elemei vonatkozásában elért előrelépések.

(7) A védekezési intézkedések szakmai elemei tekintetében, továbbfejlesztett rendelkezések készülnek: a vizsgált minták megőrzésének módjára vonatkozóan a károsító visszakövetésének biztosítása érdekében, a feltételezhető fertőzöttség mértékének meghatározására, a károsító bármely igazolt előfordulása és a vonatkozó fertőzött övezet bejelentésének részleteire, valamint a fertőzöttnek minősített termesztési helyeken és a kijelölt övezeteken belül alkalmazandó intézkedésekre vonatkozóan.

(8) Az ebben az irányelvben előírt intézkedések összhangban vannak a Növény-egészségügyi Állandó Bizottság véleményével,

ELFOGADTA EZT AZ IRÁNYELVET:

1. cikk

A 93/85/EGK irányelv mellékletei helyébe ezen irányelv mellékletének a megfelelő szövege lép.

2. cikk

(1) A tagállamok legkésőbb 2007. március 31-ig elfogadják és kihirdetik azokat a rendelkezéseket, amelyek szükségesek ahhoz, hogy ennek az irányelvnek megfeleljenek. Haladéktalanul tájékoztatják a Bizottságot e rendelkezések szövegéről, valamint az e rendelkezések és az irányelv közötti megfelelési táblázatról.

Ezeket a rendelkezéseket 2007. április 1-jétől kell alkalmazni.

Amikor a tagállamok elfogadják ezeket a rendelkezéseket, azokban hivatkozni kell erre az irányelvre, vagy azokhoz hivatalos kihirdetésük alkalmával ilyen hivatkozást kell fűzni. A hivatkozás módját a tagállamok határozzák meg.

⁽¹⁾ HL L 259., 1993.10.18., 2. o.

(2) A tagállamok haladéktalanul közlik a Bizottsággal nemzeti joguknak azokat a főbb rendelkezéseit, amelyeket az ezen irányelv által szabályozott területen fogadnak el. A Bizottság tájékoztatja erről a többi tagállamot.

3. cikk

Ez az irányelv az *Európai Unió Hivatalos Lapjában* való kihirdetését követő harmadik napon lép hatályba.

4. cikk

Ennek az irányelvnek a tagállamok a címzettjei.

Kelt Brüsszelben, 2006. június 12-én.

a Bizottság részéről
Markos KYPRIANOU
a Bizottság tagja

I. MELLÉKLET

VIZSGÁLATI PROGRAM A GYŰRŰS ROTHADÁS BAKTÉRIUM, *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* (Smith) Davis *et al.* ssp. *SEPEDONICUS* (Spieckermann *et* Kothhoff) Davis *et al.* DIAGNOSZTIZÁLÁSÁRA, KIMUTATÁSÁRA ÉS AZONOSÍTÁSÁRA**A VIZSGÁLATI PROGRAM HATÓKÖRE**

A bemutatott program az alábbi esetekben használt eljárások leírását tartalmazza:

- i. A gyűrűs rothadás diagnosztizálása burgonyagumókban és burgonyanövényekben;
- ii. A *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* kimutatása burgonyagumó- és burgonyanövény-mintákban;
- iii. A *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*C. m.* subsp. *sepedonicus*) azonosítása.

ÁLTALÁNOS ALAPELVEK

A különböző módszerek optimalizált protokolljai, a validált reagensek, valamint a vizsgálati- és a kontrollanyagok elkészítésének részletei megtalálhatók a függelékekben. A protokollok optimalizálásába és validálásába bevont laboratóriumok felsorolása az 1. függelékben található.

Mivel a protokollok egy zárlati károsító kimutatásával járnak, és életképes *C. m.* subsp. *sepedonicus* tenyészetek kontrollanyagként történő felhasználását fogják magukban foglalni, szükséges lesz, hogy az eljárások elvégzésére megfelelő növény-egészségügyi zárlati feltételek mellett – beleértve a hulladék ártalmatlanítására szolgáló megfelelő berendezéseket – valamint a hivatalos növény-egészségügyi zárlatért felelős hatóságok által kiállított megfelelő engedély feltételei szerint kerüljön sor.

A vizsgálati paramétereknek biztosítaniuk kell a *C. m.* subsp. *sepedonicus* szintjének következetes és reprodukálható kimutatását a kiválasztott módszerek megadott küszöbértéke esetén.

A pozitív kontrollok precíz elkészítése elengedhetetlenül szükséges.

A szükséges küszöbértékek szerinti vizsgálat ugyancsak magában foglalja az eszközök helyes beállítását, karbantartását és kalibrációját, a reagensek gondos kezelését és megőrzését, valamint minden olyan intézkedést, amely a minták közötti átfertőződés megakadályozását szolgálja, pl. a pozitív kontrollok elválasztása a vizsgálati mintáktól. Az adminisztratív és egyéb hibák elkerülése érdekében minőségellenőrzési előírásokat kell alkalmazni, különösen a címkézés és a dokumentáció vonatkozásában.

A károsító előfordulásának a 93/85/EGK irányelv 4. cikke (2) bekezdésében említett gyanúja feltételezi a folyamatábrákban meghatározott mintán elvégzett diagnosztikai vagy szűrővizsgálatok pozitív eredményét.

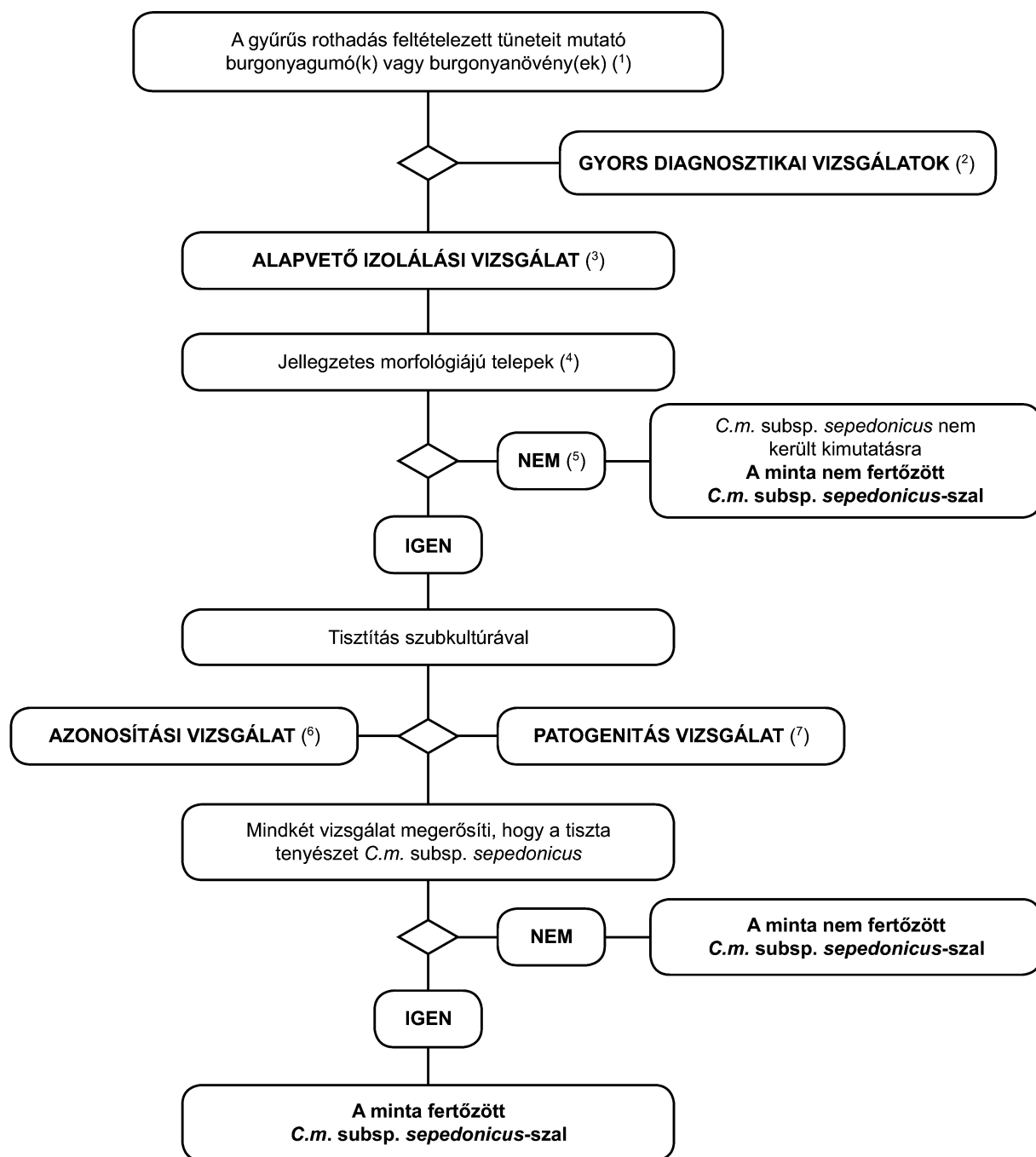
Ha az első szűrővizsgálat (IF vagy PCR/FISH) pozitív, akkor a Cms-sel való fertőzöttség gyanúja fennáll, és egy második szűrővizsgálatot kell elvégezni. Ha a második szűrővizsgálat pozitív, akkor a gyanú megerősítésre került (gyanított előfordulás), és az eljárás szerinti vizsgálatokat kell lefolytatni. Ha a második szűrővizsgálat negatív, akkor úgy tekintik, hogy a minta nem fertőzött a Cms-sel.

Ezért a 4. cikk (2) bekezdésében említett pozitív IF-tesztet a pozitív IF-leolvasás határozza meg, melyet a második szűrővizsgálat (PCR/FISH) erősít meg.

A 93/85/EGK irányelv 5. cikke (1) bekezdésében említett megerősített előfordulás feltételezi a *C. m.* subsp. *sepedonicus* tiszta tenyészetének izolálását és azonosítását, beleértve a patogenitás megerősítését.

1. A FOLYAMATÁBRÁK ISMERTETÉSE**1.1. Kimutatási program a gyűrűs rothadás diagnosztizálására a gyűrűs rothadás tüneteit mutató burgonyagumókban és burgonyanövényekben**

A vizsgálati eljárás a gyűrűs rothadás jellegzetes vagy gyanított tüneteit mutató burgonyagumók és burgonyanövények vizsgálatára szolgál. Tartalmaz egy gyors szűrővizsgálatot, a kórokozó fertőzött edénynyaláb-szövetből történő izolálását diagnosztikai táptalajon, és – pozitív eredmény esetén – a tenyészet azonosítását *C. m.* subsp. *sepedonicus*-ként.



⁽¹⁾ A tünetek leírását a 2. szakasz tartalmazza.

⁽²⁾ A megfelelő vizsgálatok a következők:
— IF-teszt (4. szakasz),
— PCR-teszt (6. szakasz),
— FISH-teszt (5. szakasz).

⁽³⁾ Bár a kórokozó általában könnyen izolálható tüneteket mutató növényanyagból hígítási lemeztenyéztéssel, a tenyésztés sikertelen lehet a fertőzés előrehaladott stádiumában. A beteg szöveten fejlődő szaprofita baktériumok gyorsabban szaporodhatnak vagy gátolhatják a kórokozót az izolációs táptalajon. Ezért ajánlatos mind nem szelektív, mind szelektív táptalajt használni, lehetőleg MTNA-t (8. szakasz) és biológiai tesztelési vizsgálatot (7. szakasz).

⁽⁴⁾ A jellegzetes morfológiájú telepek leírása a 8. szakaszban található.

⁽⁵⁾ Ha az izolálási vizsgálat negatív, de a betegség tünetei jellegzetesek, akkor az izolálást meg kell ismételni.

⁽⁶⁾ A *C.m. subsp. sepedonicus* tiszta tenyészeitének megbízható azonosítására a 9. szakaszban leírt vizsgálatok elvégzése révén kerül sor.

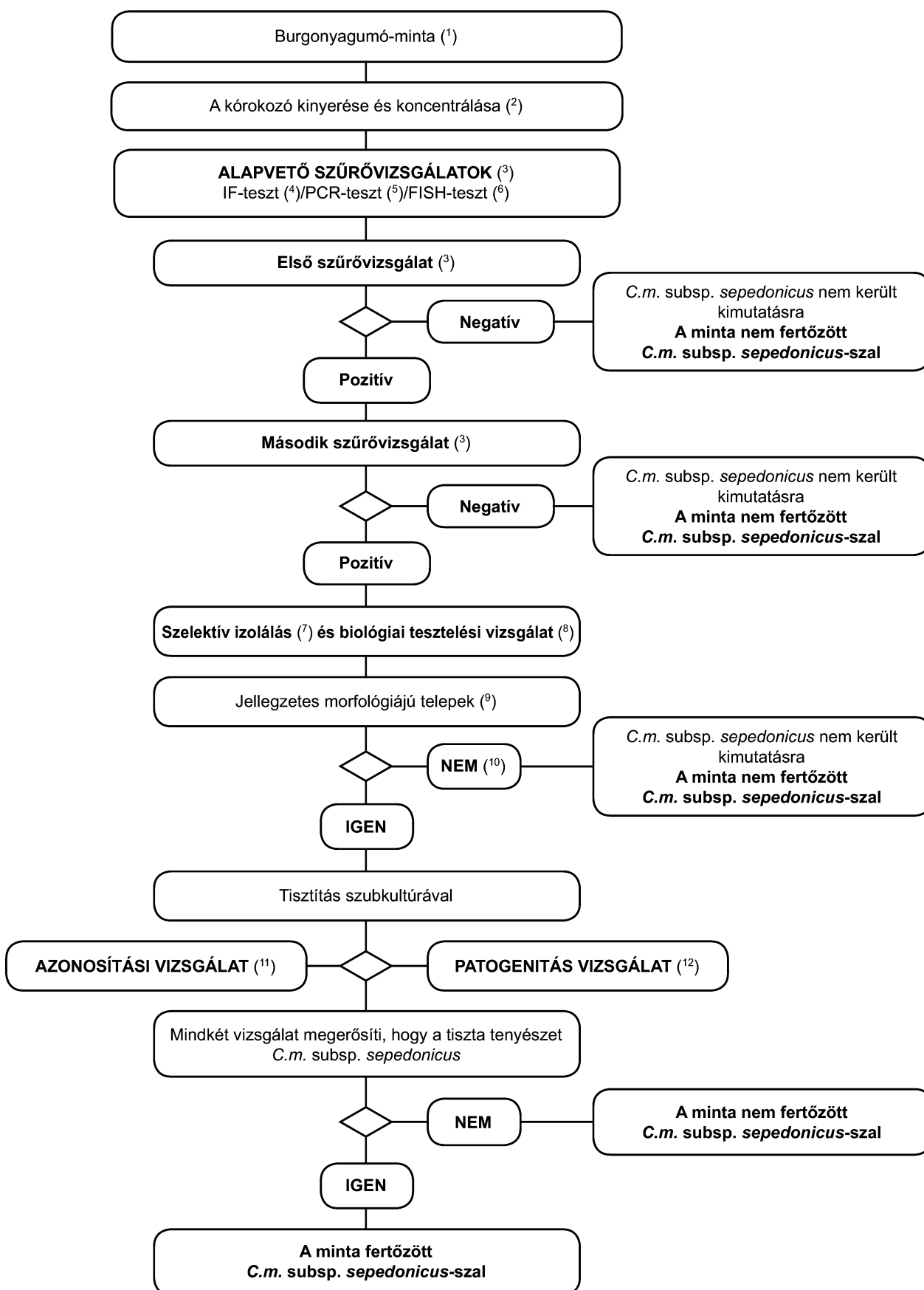
⁽⁷⁾ A patogenitás vizsgálat leírása a 10. szakaszban található.

1.2. **A *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* tünetmentes burgonyagumó-mintákban történő kimutatásának és azonosításának programja**

Az alapelv

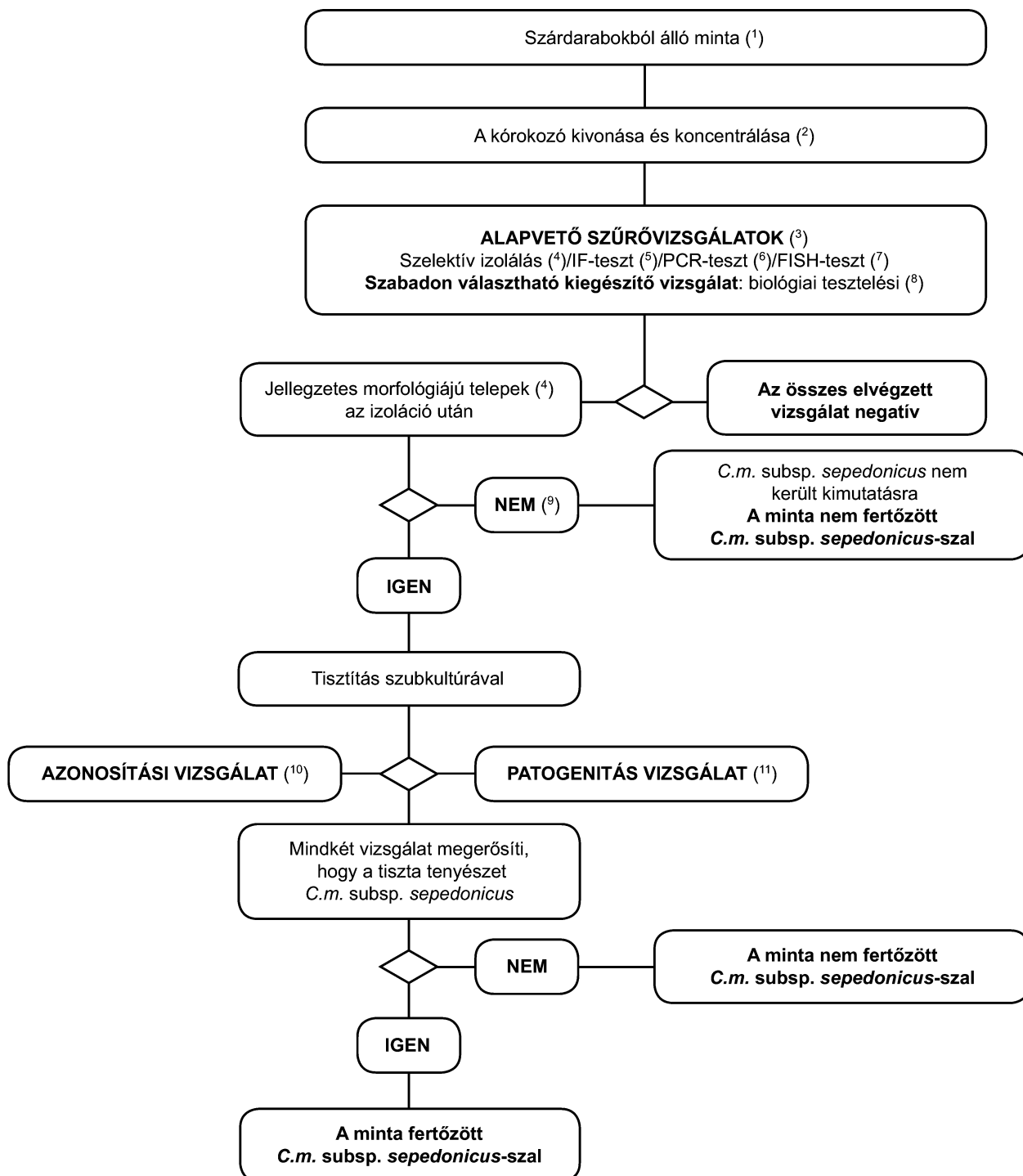
A vizsgálati eljárás a látens fertőzések burgonyagumókban történő kimutatására szolgál. Legalább két – eltérő biológiai elven alapuló – szűrővizsgálat pozitív eredményét ki kell egészíteni a kórokozó izolálásával; ezt jellemző telepek izolálása esetén a tiszta tenyészet *C. m. subsp. sepedonicus*-ként történő azonosítása követi. Mindössze egy szűrővizsgálat pozitív eredménye nem elegendő a minta gyanúsának tekintéséhez.

A szűrővizsgálatoknak és az izolálási vizsgálatoknak lehetővé kell tenniük 10^3 – 10^4 sejt/ml újraszuszpendált üledékben kimutatását, amely pozitív kontrollként kerül alkalmazásra minden egyes vizsgálati sorozatnál.



- (¹) A standard mintaméret 200 gumó, bár az eljárás alkalmazható kisebb mintára is, ha 200 gumó nem áll rendelkezésre.
- (²) A kórokozó kinyerésére és koncentrálására szolgáló módszerek leírása a 3.1. szakaszban található.
- (³) Ha legalább két – eltérő biológiai elveken alapuló – vizsgálat pozitív, az izolálást és a megerősítést el kell végezni. Végezzen el legalább egy szűrővizsgálatot. Amennyiben ez a vizsgálat negatív, a minta negatívnak tekinthető. Abban az esetben, ha ez a vizsgálat pozitív, még egy vagy több – eltérő biológiai elveken alapuló – szűrővizsgálat elvégzése szükséges az első pozitív eredmény megerősítéséhez. Ha a második vagy a többi vizsgálat negatív, a minta negatívnak tekinthető. További vizsgálatra nincs szükség.
- (⁴) Immunfluoreszcenciás (IF) vizsgálat.
Mindig poliklonális ellenanyagot használjon az IF szűréshez, a kiegészítőleg használt monoklonális ellenanyagokkal fokozható a specifikusság (lásd a 4. szakaszt).
- (⁵) PCR-teszt.
Megfelelően validált PCR-reagenseket és protokollokat használjunk (lásd a 6. szakaszt).
- (⁶) Fish-teszt.
Validált reagenseket és protokollokat használjunk (lásd az 5. szakaszt).
- (⁷) Szelektív izolálás.
MTNA táptalajjal vagy NCP-88 táptalajjal és az újrászuszpendált üledék 1/100 hígításával, ez sok esetben alkalmas módszer a *C. m. subsp. sepedonicus* közvetlen izolálására. A jellegzetes telepek 3–10 nappal a lemeztenyésztés után nyerhetők. Ekkor lehet a kórokozót tisztítani és azonosítani. A vizsgálat teljes potenciáljának kiaknázásához gondosan kell eljárni a köldökrész egy darabjának kimetszésekor, hogy kiküszöböljük a burgonyagumóhoz kapcsolódó másodlagos baktériumok jelenlétét, melyek versenytársai a *C. m. subsp. sepedonicus*-nak a táptalajon, és gyorsabban szaporodhatnak a kórokozónál. Ha a lemeztenyésztés sikertelen, az izolálást a biológiai tesztelési vizsgálatához használt növényekről kell elvégezni (lásd a 8. szakaszt).
- (⁸) A biológiai tesztelési vizsgálat a *C. m. subsp. sepedonicus* burgonyakivonat üledékből – tojásgyümölcsben (*Solanum melongena*) végzett szelektív dúsítás révén – történő izolálására szolgál. A vizsgálatához optimális inkubálási feltételekre van szükség, amelyek ennél a módszernél kerültek meghatározásra. A *C. m. subsp. sepedonicus*-t az MTNA vagy az NCP-88 táptalajon gátló baktériumok nagy valószínűséggel nem fogják befolyásolni ezt a vizsgálatot (lásd a 7. szakaszt).
- (⁹) A jellegzetes morfológiájú telepek leírása a 8. szakaszban található.
- (¹⁰) A tenyésztés vagy a biológiai tesztelési vizsgálat sikertelen lehet a szaprofita baktériumok által okozott verseny vagy gátlás következtében. Ha a szűrővizsgálatok eredményei pozitívak, de az izolálási vizsgálatok negatívak, akkor az izolálási vizsgálatokat meg kell ismételni ugyanazon üledék felhasználásával vagy ugyanazon mintából, a szétvágtott gumók köldökrésze közeléből vett további edénynyaláb-szövevvel, és – szükség esetén – újabb mintákat kell megvizsgálni.
- (¹¹) A vélelmezett *C. m. subsp. sepedonicus* tiszta tenyészetek megbízható azonosítására a 9. szakaszban leírt vizsgálatok elvégzése révén kerül sor.
- (¹²) A patogenitás vizsgálat leírása a 10. szakaszban található.

- 1.3. A *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* tünetmentes burgonyanövényekből történő kimutatásának és azonosításának programja



- (¹) Az ajánlott mintaméreteket a 3.2. szakasz tartalmazza.
- (²) A kórokozó kivonására és koncentrálására szolgáló módszerek leírása a 3.2. szakaszban található.
- (³) Ha legalább két – eltérő biológiai elveken alapuló – vizsgálat pozitív, az izolálást és a megerősítést el kell végezni. Végezzen el legalább egy szűrővizsgálatot. Amennyiben ez a vizsgálat negatív, a minta negatívnak tekinthető. Abban az esetben, ha ez a vizsgálat pozitív, még egy vagy több – eltérő biológiai elveken alapuló – szűrővizsgálat elvégzése szükséges az első pozitív eredmény megerősítéséhez. Ha a második vagy a többi vizsgálat negatív, a minta negatívnak tekinthető. További vizsgálatra nincs szükség.
- (⁴) A szelektív izolációs vizsgálat és a jellegzetes morfológiájú telepek leírása a 8. szakaszban található.
- (⁵) Az IF-teszt leírása a 4. szakaszban található.
- (⁶) A PCR-tesztek leírása a 6. szakaszban található.
- (⁷) A FISH-teszt leírása az 5. szakaszban található.
- (⁸) A biológiai tesztelési vizsgálat leírása a 7. szakaszban található.
- (⁹) A tenyésztés vagy a biológiai tesztelési vizsgálatok sikertelenek lehetnek a szaprofita baktériumok által kiváltott verseny vagy gátlás következtében. Ha a szűrővizsgálatok eredménye pozitív, de az izolálási vizsgálatok negatívak, akkor az izolálási vizsgálatokat meg kell ismételni, és – ha szükséges – további mintákat kell megvizsgálni.
- (¹⁰) A vélelmezett *C. m. subsp. sepedonicus* tiszta tenyészetek megbízható azonosítására a 9. szakaszban leírt vizsgálatok elvégzése révén kerül sor.
- (¹¹) A patogenitás vizsgálat leírása a 10. szakaszban található.

2. A GYŰRŰS ROTHADÁS TÜNETEINEK SZEMREVÉTELEZÉSES VIZSGÁLATA

2.1. Burgonyanövények

Az európai éghajlati adottságok között a tünetek ritkán észlelhetők a szántóföldön, és gyakran csak a tenyészidőszak végén. Továbbá a tüneteket gyakran elfedik más betegségek, az öregedés vagy mechanikai sérülések, illetve azokkal keverik össze a tüneteket. Ezért a tünetek könnyen észrevétlenek maradnak a szántóföldi vizsgálatok során. A hervedási tünetek nagyon különböznek a barna rothadásnál jelentkezőktől; a hervedás rendszerint lassú, és eleinte a levélszélékre korlátozódik. A fertőzött fiatal levelek gyakran továbbra is fejlődnek, bár a fertőzött részekben kisebb mértékben. Ez szabálytalan alakú levelek kialakulásához vezet. A lejjebb a szárban lévő edénnyaláb-szövetek elzáródása által befolyásolt leveleken gyakran alakulnak ki klorotikus levél közötti foltok, melyek színe a sárgától a narancssárgáig terjed. A fertőzött levélkék, levelek és végül még a száraz is elpusztulhatnak. Gyakran a levelek és a gumók egyszerűen csak elsorvadnak. Esetenként a növények visszamaradnak a fejlődésben. A honlapon megtalálható egy sor tünet színes fényképe: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

2.2. Burgonyagumók

A legkorábbi tünet a szövet enyhe üvegeessége vagy áttetszősége a körülötte lévő edénnyaláb-rendszer megpuhulása nélkül, különösen a köldökrészhez közel. A köldökrészen lévő edénnyaláb-gyűrű színe kissé sötétebb lehet a normálnál. Az első könnyen azonosítható tünet az, amikor az edénnyaláb-gyűrű sárgás elszíneződést mutat, és a gumóból enyhe nyomásra sajtyszerű anyag tör elő oszlop alakban az edénnyalábokból. Ez a váladék baktériumok millióit tartalmazza. Az edénnyaláb-szövet megbarnulhat, és a gumón jelentkező tünetek ebben a stádiumban hasonlítanak a *Ralstonia solanacearum* által okozott barna rothadás tüneteire. Először ezek a tünetek a gyűrű egyik szakaszára korlátozódhatnak, nem feltétlenül a köldökrészhez közelre, majd fokozatosan kiterjedhetnek az egész gyűrűre. A fertőzés előrehaladtával az edénnyaláb-szövet pusztul; a külső hancsrész elválhat a belsőtől. A fertőzés előrehaladott stádiumaiban a gumó felszínén repedések jelennek meg, melyek szélei gyakran vörösesbarnák. Az utóbbi időben Európában számos olyan eset volt, amikor a középső hancsrész az edénnyaláb-gyűrűvel párhuzamosan rothadt, ami másodlagos inváziót eredményezett belső üregképződéssel és nekrozissal. A másodlagos gombás vagy baktériumos invázió elfedheti a tüneteket, és nehezzé, sőt lehetetlenné is válhat, az előrehaladott gyűrűs rothadás tüneteinek megkülönböztetése más gumórothadásoktól. Atipikus tünetek is lehetnek. A honlapon megtalálható egy sor tünet színes fényképe: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

3. MINTAELŐKÉSZÍTÉS

3.1. Burgonyagumók

Megjegyzés:

- A standard mintaméret 200 burgonyagumó vizsgálatonként. Intenzívebb mintavétel esetén több vizsgálatot kell elvégezni ekkora mintákon. Ha ennél több burgonyagumót tartalmaz a minta, az gátláshoz vagy nehezen értelmezhető eredményekhez vezet. Az eljárás azonban könnyen alkalmazható 200-nál kevesebb burgonyagumóból álló mintákra is, amennyiben kevesebb burgonyagumó áll rendelkezésre.
- Az alábbiakban leírt valamennyi kimutatói módszer validálása 200 burgonyagumóból álló minták vizsgálatán alapszik.
- Az alábbiakban leírt burgonyakivonat felhasználható a burgonya barna rothadás baktérium, a *Ralstonia solanacearum* kimutatására is.

A mintaelőkészítést megelőző, szabadon választható előkezelés:

Mossuk le a burgonyagumókat. Használjunk megfelelő fertőtlenítőszereket (a PCR-teszt alkalmazása esetén klórvagyületeket az esetleges kórokozó DNS-ek eltávolítása céljából) és mosószereket az egyes minták között. Levegőn szárítsuk meg a burgonyagumókat. Ez a lemosási eljárás különösen akkor hasznos (de nem kötelező), ha a minták földesek, és ha PCR-tesztet vagy közvetlen izolálási eljárást kell alkalmazni.

- 3.1.1. Távolítsuk el tiszta, fertőtlenített szikével vagy gyümölcskéssel a burgonyagumó köldökrészén a héjat úgy, hogy az edénnyaláb-szövetek láthatóvá váljanak. Óvatosan vágjunk ki egy kis darabot az edénnyaláb-szövetből a köldökrészen, és tartsuk a nem edénnyaláb-szövet mennyiségét minimális szinten (lásd a honlapot: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>)

Megjegyzés:

Tegyük félre a feltételezett tüneteket mutató (rothadó) burgonyagumókat, és vizsgáljuk azokat külön.

Ha a köldökrészből vett darab eltávolítása során a gyűrűs rothadás feltételezett tünetei észlelésére kerül sor, akkor a köldökrész közelében a gumó elvágása után el kell végezni az adott burgonyagumó szemrevételezéses vizsgálatát. A feltételezett tüneteket mutató, elvágott gumókat szobahőmérsékleten kell parásítani 2 napig, majd tároljuk a gumókat hűtőszekrényben (4–10 °C között) megfelelő növény-egészségügyi zárlati feltételek mellett a vizsgálatok befejezéséig. Minden burgonyagumót (beleértve a gyanús tüneteket mutatókat is), a II. melléklet szerint kell tárolni.

- 3.1.2. A köldökrészből vett darabokat még nem használt, becsukható és/vagy lezárható egyszer használatos tartályokban gyűjtsük össze (amennyiben a tartályok ismét felhasználásra kerülnek, akkor azokat alaposan ki kell tisztítani, és klórvegyületekkel fertőtleníteni kell). A köldökrészből vett darabokat lehetőleg azonnal fel kell dolgozni. Ha ez nem lehetséges, akkor azokat a tartályban kell tárolni, puffer hozzáadása nélkül, hűtött állapotban legfeljebb 72 órán át vagy szobahőmérsékleten legfeljebb 24 órán át. A darabok száradása és parásodása, valamint a szaprofita baktériumok elszaporodása a tárolás során akadályozhatja a gyűrűs rothadás baktérium kimutatását.
- 3.1.3. Dolgozzuk fel a köldökrészből vett darabokat a következő eljárások egyikével:
- a) Töltsünk a darabokra megfelelő mennyiségű (mintegy 40 ml) kivonópuffert (3. függelék), és rázzuk rotációs rázógépen (50–100 fordulat/perc) 4 órán át 24 °C alatt, vagy 16–24 órán át hűtött állapotban.
 - b) Homogenizáljuk a darabokat megfelelő mennyiségű (mintegy 40 ml) kivonópufferrel (3. függelék) aprítógépben (pl. Waring vagy Ultra Thurax), vagy lezárt, egyszer használatos macerációs tasakban (pl. Stomacher vagy Bioreba, erős guage polietilén, 150 mm × 250 mm; sugárzással sterilizált) gumikalapáccsal vagy megfelelő zúzóberendezéssel (pl. Homex) történő összezúzás útján.

Megjegyzés:

A minták keresztbe fertőződésének nagy a veszélye az aprítógépben történő homogenizálás esetén. Tegyük óvintézkedéseket az aeroszol képződés és a kilöttyenés elkerülése érdekében a kivonási eljárás során. Biztosítsuk, hogy frissen sterilizált aprítókések és edények kerüljenek felhasználásra minden mintánál. A PCR-teszt elvégzésekor kerüljük el a DNS-ek áthozatalát a tartályokon vagy a zúzóberendezésen. A PCR alkalmazásánál az egyszer használatos tasakokban történő összezúzás és egyszer használatos kémcsövek használata ajánlott.

- 3.1.4. Fejtsük le a felülúszó folyadékot. Ha nagyon zavaros, ülepítsük lassú centrifugálással (legfeljebb 180 g-vel, 10 percig, 4–10 °C közötti hőmérsékleten) vagy vákuumszűréssel (40–100 µm) a szűrőt további (10 ml) kivonópufferrel átmosva (3. függelék).
- 3.1.5. Koncentráljuk a baktérium frakciót 7 000 g-vel 15 percig (vagy 10 000 g-vel 10 percig) tartó centrifugálással 4–10 °C közötti hőmérsékleten, és távolítsuk el a felülúszó folyadékot a üledék felkavarása nélkül.
- 3.1.6. Szuszpendáljuk újra a üledéket 1,5 ml üledék-pufferben (3. függelék). Használjunk 500 µl-t a *C. m. subsp. sepedonicus*-hoz, 500 µl-t a *Ralstonia solanacearum*-hoz és 500 µl-t referencia célokra. Adjunk hozzá steril glicerint, melynek végkoncentrációja 10–25 % (v/v), a referencia mennyiség 500 µl-éhez és a fennmaradó vizsgálati mennyiséghez, Vortex-szel keverjük össze, és tároljuk – 16 és – 24 °C között (hetekig) vagy – 68 és – 86 °C között (hónapokig). A vizsgálat során a vizsgálati aliquotokat 4–10 °C-on tartjuk.

A többszöri lefagyasztás és felengedés nem ajánlott.

Ha szükséges a kivonat szállítása, akkor biztosítsuk, hogy a szállítás hűtőtáskában történjen 24–48 órán belül.

- 3.1.7. Rendkívül fontos, hogy az összes *C. m. subsp. sepedonicus* pozitív kontrollt és mintát külön kezeljük a fertőzés elkerülése érdekében. Ez vonatkozik az IF-lemezekre és minden vizsgálatra.

3.2. Burgonyanövények

Megjegyzés:

A látns *C. m. subsp. sepedonicus* populációk kimutatásához összetett minták vizsgálata ajánlott. Az eljárás könnyen alkalmazható a legfeljebb 200 szárdarabból álló összetett mintákra. (Amennyiben vizsgálatokat végzünk, azoknak a vizsgálat alatt álló növény-populáció statisztikailag reprezentatív mintáján kell alapulniuk.)

- 3.2.1. Tiszta, fertőtlenített késsel vagy metszőollóval távolítsunk el egy 1–2 cm-es darabot mindegyik szár tövéből közvetlenül a földfelszín felett.

Fertőtlenítsük rövid ideig a szárdarabokat 70 %-os etil-alkohollal, és itatóspapíron azonnal itassuk szárazra azokat.

Gyűjtsük a szárdarabokat egy zárt és steril tartályban a következő mintavételi eljárásoknak megfelelően:

3.2.2. Dolgozzuk fel a szárdarabokat az alábbi eljárások egyikével:

- a) Töltsünk a darabokra megfelelő mennyiségű (mintegy 40 ml) kivonópuffert (3. függelék), és rázzuk rotációs rázógépen (50–100 rpm) 4 órán át 24 °C alatt, vagy hűtötten 16–24 órán át.
- b) Azonnal dolgozzuk fel a darabokat erős macerációs tasakban (pl. Stomacher vagy Bioreba) történő összeűrés útján megfelelő mennyiségű kivonópuffer hozzáadásával (3. függelék) gumikalapács vagy megfelelő zúzóberendezés (pl. Homex) felhasználásával. Ha ez nem lehetséges, tároljuk a szárdarabokat hűtve legfeljebb 72 órán át, vagy legfeljebb 24 órán át szobahőmérsékleten.

3.2.3. Fejtsük le a felülúszó folyadékot 15 perces ülepítés után.

3.2.4. A kivonat további ülepítése vagy a baktérium frakció koncentrációja általában nem szükséges, de szűrővel és/vagy centrifugálással elérhető a 3.1.4–3.1.6. szakaszban leírtak szerint.

3.2.5. Osszuk a híg vagy koncentrált mintakivonatot két egyenlő részre. Az egyik felét tartsuk 4–10 °C között a vizsgálat során, a másik felét pedig tároljuk 10–25 % (v/v) steril glicerinnel – 16 és – 24 °C között (hetekig) vagy – 68 és – 86 °C között (hónapokig), arra az esetre, ha további vizsgálatokat kell végezni.

4. IF-teszt

Az alapelv

Az IF-teszt elsőszámú szűrővizsgálatként történő használata ajánlott, mivel bizonyított megbízhatósága a szükséges küszöbértékek elérésében.

Amennyiben az IF-tesztet használjuk elsőszámú szűrővizsgálatként, és az IF eredménye pozitív, második szűrővizsgálatként el kell végezni az izolálást, a PCR-vagy a FISH-vizsgálatot. Amennyiben az IF-tesztet második szűrővizsgálatként használjuk, és az IF eredménye pozitív, további vizsgálatra van szükség a folyamatábrának megfelelően az elemzés befejezéséhez.

Megjegyzés:

Mindig poliklonális ellenanyagot használunk, ha az IF-tesztet használjuk elsőszámú szűrővizsgálatként. Abban az esetben, ha az IF leolvasás pozitív egy poliklonális ellenanyaggal, a minta további szűrése egy monoklonális ellenanyaggal specifikusabb eredményt adhat, de kisebb lehet az érzékenység.

A *C. m. subsp. sepedonicus* egyik referenciatörzsének ellenanyagát használjuk. Ajánlott a titer minden egyes új ellenanyag-tételre meghatározni. A titer úgy van definiálva, hogy az a legmagasabb hígítás, melyen optimális reakció megy végbe a *C. m. subsp. sepedonicus* homológ törzsének 10^5 – 10^6 sejt/ml-es szuszpenziója vizsgálatánál a megfelelő fluoreszcein-izotiocianát (FITC) konjugátumnak a gyártó ajánlása szerint történő felhasználása esetén. A nyers poliklonális vagy monoklonális ellenanyagoknak legalább 1:2000-es IF-titernek kell lenniük. A vizsgálat során az ellenanyagokat a titerhez közeli vagy azzal megegyező munkahígítás(ok)ban (WD) kell használni. Használjunk validált ellenanyagokat (lásd a honlapot: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

A vizsgálatot frissen készített mintakivonatokon kell elvégezni. Szükség esetén sikeresen elvégezhető – 68 és – 86 °C között glicerinnel tárolt kivonatokon. A glicerinnel 1 ml üledékpuffer hozzáadásával (4. függelék) eltávolítható a mintáról, újracentrifugálás 15 percen át 7 000 g-vel, és újrászuszpendálás azonos térfogatú üledékpufferben. Ez gyakran nem szükséges, különösen, ha a mintalemezen a mintákat láng segítségével a lemezekhez rögzítjük (lásd 2.2).

Készítsünk külön pozitív kontroll-lemezeket a homológ törzsből vagy a *C. m. subsp. sepedonicus* bármely más referenciatörzséből, burgonyakivonatban – a 2. függelékben leírtak szerint – és szabadon választhatóan pufferben szuszpendálva.

Természetes úton fertőződött (liofilizálással vagy – 16 és – 24 °C közötti fagyasztással fenntartott) szövetet kell használni – amennyiben lehetséges – hasonló kontrollként ugyanazon a lemezen.

Negatív kontrollként olyan mintakivonatokat lehet használni, melynek korábbi vizsgálata negatív eredményt hozott.

Használjunk több mintahelyes tárgylemezeket lehetőleg 10 darab, legalább 6 mm átmérőjű ablakkal.

A kontrollanyagot a mintával/mintákkal azonos módon vizsgáljuk.

4.1. A tesztlemezeket a következő eljárások egyikével készítjük el:

i. Viszonylag kevés keményítő üledéket tartalmazó üledékek esetén:

Pipetázunk egy kimért, meghatározott térfogatot (15 µl megfelelő a 6 mm-es ablakátmérőhöz – nagyobb ablakokhoz használunk arányosan nagyobb térfogatot) az újrászuszpendált burgonyaiüledék 1/100 hígításából az első ablakra. Ezután pipetázunk hasonló térfogatot a hígítatlan üledékből (1/1) a sor fennmaradó ablakaira. A második sor használható ismétlésként vagy egy második mintaként, amint azt az 1. ábra mutatja.

ii. Egyéb üledékek esetén:

Készítünk tízes hígítási sorozatot (1/10, 1/100) az újrászuszpendált üledékből üledékpufferben. Pipetázunk egy meghatározott térfogatot (15 µl megfelelő a 6 mm-es ablakátmérőhöz – nagyobb ablakokhoz használunk arányosan nagyobb térfogatot) az újrászuszpendált üledékből és mindegyik hígításból az ablakok sorára. A második sor használható ismétlésként vagy egy második mintaként, amint azt a 2. ábra mutatja.

4.2. Szárítsuk a cseppeket szobahőmérsékleten vagy 40–45 °C-os hőmérsékletre történő melegítéssel. Rögzítsük a baktériumsejteket a lemezhez hevítéssel (15 percig 60 °C-on), lelángolással vagy 95 %-os etil-alkohollal, vagy az ellenanyagok szállítójának specifikus útmutatása szerint.

Szükség esetén a rögzített lemezeket ezután egy száraz dobozban fagyaszttva lehet tárolni a szükséges ideig (legfeljebb 3 hónapig) a további vizsgálatok elvégzését megelőzően.

4.3. IF-eljárás

i. A 4.1. i. pontban leírt tesztlemez-készítési eljárás szerint:

Készítünk egy sorozatot a kétszeres hígításokból. Az első mintahely tartalmazza a titer 1/2-ét (T/2), a többi a titer 1/4-ét (T/4), a titer 1/2-ét (T/2), a titer (T) és a titer kétszeresét (2T).

ii. A 4.1. ii. pontban leírt tesztlemez-készítési eljárás szerint:

Készítsük el az ellenanyag munkahígítását (WD) IF-pufferben. A munkahígítás befolyásolja a specifikusságot.

1. ábra A tesztlemez elkészítése a 4.1. i. és a 4.3. i. pont szerint

		Az újrászuszpendált üledék hígításai						
		1/100	1/1	1/1	1/1	1/1	☐	Az újrászuszpendált üledék hígításai
(T = titer)		T/2	T/4	T/2	T	2T	☐	Az antiszérum/ellenanyag kétszeres hígításai
1. minta								
		1	2	3	4	5		
Az 1. minta ismétlése vagy 2. minta								
		6	7	8	9	10		

2. ábra A tesztlemez elkészítése a 4.1. ii. és a 4.3. ii. pont szerint

Az antiszérum/ellenanyag munkahígítása						☐ Az újraszuszpendált üledék tizedes hígítása
	1/1	1/10	1/100	üres	üres	
1. minta						
	1	2	3	4	5	
Az 1. minta ismétlése vagy 2. minta						
	6	7	8	9	10	

- 4.3.1. Rendezzük el a tesztlemezeket nedves papíron. Borítsuk a tesztblakokat teljesen az ellenanyag hígításával (hígításaival). Az ablakokra felvitt ellenanyag térfogatának legalább akkorának kell lennie, mint az alkalmazott kivonat térfogata.

A következő eljárást abban az esetben kell elvégezni, ha az ellenanyagok szállítója nem szolgáltatott specifikus útmutatásokat:

- 4.3.2. Lefedve inkubáljuk a tesztlemezeket nedves papíron 30 percig szobahőmérsékleten (18–25 °C).
- 4.3.3. Rázzuk le a cseppeket a tesztlemezekről, és gondosan öblítsük le azokat IF-pufferrel. Alámerítve mossuk 5 percig IF-puffer-Tween-ben (4. függelék), és ezt követően IF-pufferben. Kerüljük el az aeroszolok vagy cseppek átvitelét, ami keresztbefertőződéshez vezethet. Gondosan távolítsuk el a felesleges nedvességet gyengéd felitatással.
- 4.3.4. Rendezzük el a tesztlemezeket nedves papíron. Borítsuk a tesztblakokat a FITC konjugátumnak a titer meghatározásához használt hígításával. Az ablakokra felvitt konjugátum térfogatának meg kell egyeznie az alkalmazott ellenanyag térfogatával.
- 4.3.5. Lefedve inkubáljuk a tesztlemezeket nedves papíron 30 percig szobahőmérsékleten (18–25 °C).
- 4.3.6. Rázzuk le a konjugátum cseppeket a tesztlemezről. Öblítsük és mossuk el a korábbiak szerint (4.3.3.).

Gondosan távolítsuk el a felesleges vizet.

- 4.3.7. Pipetázunk 5–10 µl 0,1 M foszfátpufferes glicerint (3. függelék) vagy valamilyen kereskedelmi forgalomban kapható fedő oldatot minden egyes ablakra, és helyezünk fel fedőlemezt.

- 4.4. Az IF-teszt leolvasása:

- 4.4.1. Tanulmányozzuk a tesztlemezeket epifluoreszcens mikroszkóppal az FITC gerjesztésére alkalmas szűrőkkel, víz- vagy olajimmerzió mellett, 500–1 000-szeres nagyításban. Alaposan vizsgáljuk át az ablakokat két egymásra merőleges átmérőjük és a területük mentén. Azon minták esetében, amelyekben egyáltalán nem vagy csak kis számban mutatkoznak sejtek legalább 40 mikroszkóp látómezőt vizsgálunk meg.

Először a pozitív kontroll-lemezt ellenőrizzük. A sejteknek fényesen kell fluoreszkálniuk, és teljes mértékű festődést kell mutatniuk a meghatározott ellenanyag titeren vagy a munkahígításon. Az IF-tesztet (4. szakasz) meg kell ismételni, ha a festődés rendellenes.

- 4.4.2. Figyeljük meg a *C. m. subsp. sepedonicus* jellegzetes morfológiájával rendelkező, fényesen fluoreszkáló sejteket a tesztlemezek tesztblakjaiban (lásd a honlapot: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). A fluoreszcencia intenzitásának meg kell egyeznie a pozitív kontroll-törzs által ugyanazon ellenanyag-hígításnál adottal. A nem teljesen festődött vagy gyengén fluoreszkáló sejteket figyelmen kívül kell hagyni.

Ha bármilyen fertőzés gyanúja felmerül, a vizsgálatot meg kell ismételni. Ilyen eset lehet, amikor egy tételben minden tesztlemez pozitív sejteket mutat a puffer fertőződésének következtében, vagy amikor pozitív sejtekre bukkanunk (a tesztblakokon kívül) a tesztlemez bevonatán.

- 4.4.3. Sok olyan probléma létezik, amely az immunfluoreszcenciás vizsgálat specifikusságából adódik. Az atipikus morfológiájú fluoreszkáló sejtek háttér-populációi és a keresztbe reagáló szaprofita baktériumok, melyek mérete és morfológiája hasonló a *C. m. sepedonicus*-éhoz, valószínűleg előfordulnak a burgonyagumó köldökrészéből vett darabokból és a szár darabjaiból készített üledékben.

4.4.4. Csak a jellemző méretű és morfológiájú, az ellenanyagok titerén vagy munkahígításán fluoreszkáló sejteket vegyük figyelembe, ahogy a 4.3. pontnál.

4.4.5. Az IF eredményének kiértékelése:

- i. Ha találunk jellegzetes morfológiájú, fényesen fluoreszkáló sejteket, akkor határozzuk meg a mikroszkóp látómezejébe eső jellemző sejtek számának középtértékét, és számítsuk ki az újrassuszpendált üledék 1 ml-ében lévő jellemző sejtek számát (4. függelék).

Az IF-teszt eredménye pozitív azon minták esetében, amelyek 1 ml újrassuszpendált üledékben legalább 5×10^3 jellemző sejtet tartalmaznak. Az ilyen minta potenciálisan fertőzöttnek minősül, és további vizsgálatok elvégzése szükséges.

- ii. Az IF-teszt eredménye negatív azon minták esetében, amelyek 1 ml újrassuszpendált üledékben kevesebb, mint 5×10^3 sejtet tartalmaznak, és az ilyen minta negatívnak minősül. További vizsgálatok elvégzése nem szükséges.

5. FISH-TESZT

Az alapelv

Amennyiben a FISH-tesztet használjuk első szűrővizsgálatként és pozitívnak bizonyul, akkor el kell végezni az izolálási eljárást vagy az IF-tesztet kötelező második szűrővizsgálatként. Amennyiben a FISH-tesztet második szűrővizsgálatként használjuk, és pozitívnak bizonyul, akkor a diagnosztizálás befejezéséhez további vizsgálat szükséges a folyamatábrának megfelelően.

Megjegyzés:

Használjunk validált *C. m. subsp. sepedonicus*-specifikus oligopróbákat (7. függelék). Az ezzel a módszerrel végzett előzetes vizsgálatnak lehetővé kell tennie a korábban negatívnak vizsgált mintakivonathoz adott legalább 10^3 – 10^4 /ml *C. m. subsp. sepedonicus* sejt reprodukálható kimutatását.

A következő eljárást lehetőleg frissen készült mintakivonaton kell elvégezni, de sikeresen elvégezhető glicerinol-datban -16 és -24 °C vagy -68 és -86 °C között tárolt mintakivonaton.

Negatív kontrollként használjuk a korábban *C. m. subsp. sepedonicus*-ra negatívnak vizsgált mintakivonatot.

Pozitív kontrollnak készítsünk szuszpenziót, amely 10^5 – 10^6 /ml 3–5 napos tenyészetből származó *C. m. subsp. sepedonicus* sejtet (pl. NCPPB 4053, vagy PD 406 törzs) tartalmaz 0,01M foszfát-pufferben (PB) (elkészítését lásd a 2. függelékben). Készítsünk külön pozitív kontroll lemezeket a homológ törzsből vagy a *C. m. subsp. sepedonicus* bármely más referenciatörzséből, burgonyakivonaton szuszpendálva, a 2. függelékben meghatározottak szerint.

A FITC-vel címkézett eubakteriális oligo-teszt használata biztosítja a hibridizáció folyamatának ellenőrzését, mivel megfesti a mintában jelen levő összes eubaktériumot.

Vizsgáljuk a kontrollanyagot a mintával/mintákkal azonos módon.

5.1. A burgonyakivonat fixálása

A következő protokoll Wullings *et al.* (1998) alapján készült:

5.1.1. Készítsünk fixálóoldatot (lásd a 7. függelékben).

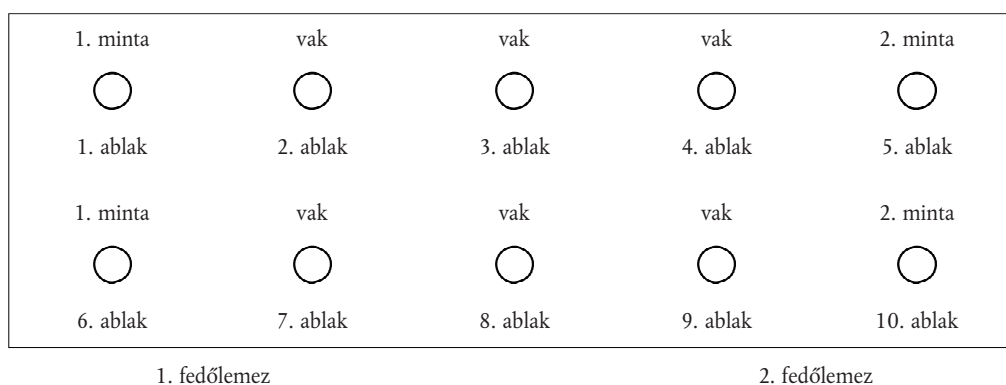
5.1.2. Pipetázzunk 100 µl-t mindegyik mintakivonatból egy Eppendorf-csőbe, és centrifugáljuk 8 percig 7 000 g-vel.

5.1.3. Távolítsuk el a felülúszó folyadékot, és oldjuk fel a üledéket 500 µl fixálóban, melyet kevesebb, mint 24 órával korábban készítettünk. Vortex-szeljük, és inkubáljuk egy éjszakán át 4 °C-on.

Egy alternatív fixáló a 96 %-os etil-alkohol. Ennek használatakor oldjuk fel a üledéket az 5.1.2. lépéstől 50 µl 0,01M PB-ben, és 50 µl 96 %-os etil-alkoholban. Vortex-szel keverjük össze, és inkubáljuk 4 °C-on 30-60 percig.

- 5.1.4. Centrifugáljuk 8 percig 7 000 g-vel, távolítsuk el a felülúszó folyadékot, és szuszpendáljuk újra a üledéket 75 µl 0,01 M PB-ben (lásd a 3. függelék).
- 5.1.5. Cseppentsünk 16 µl-t a fixált szuszpenzióból egy tiszta többablakos lemezre, ahogy a 3. ábra mutatja. Két különböző mintát használunk lemezenként hígítatlanul, és használunk 10 µl-t egy 1:100 hígításhoz (0,01 M PB-ben). A maradék mintaoldatot (49 µl) tárolhatjuk – 20 °C-on 1 térfogatnyi 96 %-os etil-alkohol hozzáadása után. Abban az esetben, ha a FISH-tesztet meg kell ismételni, távolítsuk el az etil-alkoholt centrifugálással, és adjunk a mintaoldathoz azonos térfogatnyi 0,01 M PB-t (keverjük össze vortex-szeléssel).

3. ábra A FISH-lemez elrendezése



- 5.1.6. Levegőn szárítsuk meg a lemezeket (vagy lemezszárítón, 37 °C-on), és rögzítsük azokat lelángolással.

Ezen a ponton az eljárást félbeszakíthatjuk, és a hibridizációval másnap folytathatjuk. A lemezeket pormentesen és szárazon kell tárolni szobahőmérsékleten.

5.2. Elő-hibridizáció és hibridizáció

- 5.2.1. Készítsünk lizozim oldatot, amely 10 mg lizozimet (Sigma L-6876) tartalmaz 10 ml pufferben (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8,0). Ezt az oldatot lehet tárolni, de csak egyszer szabad lefagyasztani/felengedni. Öntsünk mindegyik ablakra hozzávetőleg 50 µl lizozim oldatot, és inkubáljuk 10 percig szobahőmérsékleten. Majd mártsuk a lemezeket ásványtalanított vízbe, csak egyszer és szárítsuk meg azokat szűrőpapírral.

Egy másik lehetőség, hogy a lizozim helyett 50 µl 40–400 µg ml⁻¹ proteináz-K-t adjunk hozzá pufferben (20 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl₂, pH 7,4) mindegyik ablakra, és inkubáljuk 37 °C-on 30 percig.

- 5.2.2. Dehidratáljuk a sejteket egy fokozatos – 50, 80 és 96 %-os – etil-alkohol sorozatban, mindegyikben 1 percig. Levegőn hagyjuk megszáradni a lemezeket egy lemeztartóban.
- 5.2.3. Készítsünk egy nedves inkubációs kamrát úgy, hogy egy légmentesen záródó doboz aljára 1x hibmix-be (7. függelék) áztatott itatós- vagy szűrőpapírt terítünk. Végezzük el a doboz előinkubálását a hibridizációs kemencében 55 °C-on legalább 10 percig.
- 5.2.4. Készítsük el a hibridizációs oldatot (7. függelék), 45 µl jusson lemezenként, és végezzünk előinkubálást 5 percig 55 °C-on.
- 5.2.5. Helyezzük a lemezeket fűtőlappra 45 °C-on, és vigyünk 10 µl hibridizációs oldatot a lemezen/lemezeken lévő mind a 4 vájlatba.
- 5.2.6. Tegyük 2 fedőlemezt (24 x 24 mm) mindegyik lemezre a levegő beszorítása nélkül. Helyezzük a lemezeket az előmelegített nedves kamrába, majd hibridizáljuk azokat egy éjszakán át a kemencében 55 °C-on sötétben.
- 5.2.7. Készítsünk el 3 főzőpoharat, melyek 1 l ultra tiszta vizet (UPW), 1 l 1x hibmix-et (334 ml 3x hibmix és 666 ml UPW) és 1 l 1/2x hibmix-et (167 ml 3x hibmix és 833 ml UPW) tartalmaznak. Végezzük el az elő-inkubációjukat vízfürdőben 55 °C-on.
- 5.2.8. Vegyük le a fedőlemezeket a lemezekről, és helyezzük a lemezeket egy lemeztartóba.
- 5.2.9. Mossuk ki a felesleges próbát a főzőpohárban 1x hibmix-szel 55 °C-on történő, 15 percig tartó inkubálással.

- 5.2.10. Vigyük át a lemeztartót 1/2 hibmix mosóoldatba, és inkubáljuk további 15 percre.
- 5.2.11. Mártuk a lemezeket rövid időre UPW-be, és tegyük őket szűrőpapírra. Távolítsuk el a felesleges nedvességet a felszínük szűrőpapírral történő óvatos leitatással. Pipetázzunk 5–10 µl fedőoldatot (pl. Vectashield-et, Vecta Laboratories, CA, USA vagy azzal egyenértékűt) mindegyik ablakra, és takarjuk le egy nagyméretű fedőlemezzel (24 x 60 mm) az egész lemezt.

5.3. A FISH-teszt leolvasása

- 5.3.1. Azonnal nézzük meg a lemezeket epifluoreszcens mikroszkóppal 630 nm hullámhosszon vagy 1 000-szeres nagyításon olajimmerzió mellett. Fluorescein-izotiocianáthoz (FITC) használható szűrővel a mintában lévő eubakteriális sejtek (beleértve a legtöbb gram-negatív sejtet) zölden fluoreszkálnak, Tetrametilrodamin-5-izotiocianáthoz használható szűrővel a *C. m. subsp. sepedonicus* Cy3-mal festett sejtei vörösen fluoreszkálnak. Hasonlítsuk össze a sejtmorfológiát a pozitív kontrollokéval. A sejteknek élénken kell fluoreszkálniuk, és teljesen meg kell festődniük. A FISH-tesztet (9.4. szakasz) meg kell ismételni, ha a festődés rendellenes. Alaposan vegyük szemügyre az ablakokat két egymásra merőleges átmérőjük és a területük mentén. Azon minták esetében, amelyekben egyáltalán nem vagy csak kis számban mutatkoznak sejtek, legalább 40 mikroszkóp látómezőt vizsgáljunk meg.
- 5.3.2. Tanulmányozzuk a *C. m. subsp. sepedonicus* élénken fluoreszkáló, jellegzetes morfológiájú sejtjeit a tesztlemezek tesztablakaiban (lásd a honlapot: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). A fluoreszkálás intenzitásának meg kell egyeznie, vagy erősebbnek kell lennie a pozitív kontroll törzsénél. A tökéletlen festődésű vagy gyengén fluoreszkáló sejteket nem szabad figyelembe venni.
- 5.3.3. Ha bármilyen fertőzés gyanúja felmerül, a vizsgálatot meg kell ismételni. Ilyen eset lehet, amikor egy tételben minden tesztlemez pozitív sejteket mutat a puffer fertőződésének következtében, vagy amikor pozitív sejtekre bukkanunk (a tesztablakokon kívül) a tesztlemez bevonatán.
- 5.3.4. Sok olyan probléma létezik, amely a FISH-teszt specifikusságából adódik. Az atipikus morfológiájú fluoreszkáló sejtek háttér-populációi és a keresztbe reagáló szaprofita baktériumok, melyek mérete és morfológiája hasonló a *C. m. subsp. sepedonicus*-éhoz, előfordulhatnak – bár sokkal ritkábban, mint az IF-tesztnél – a burgonyagumó koldokrézéből vett darabokból és a szár darabjaiból készített üledékben.
- 5.3.5. Csak a jellemző méretű és morfológiájú, fluoreszkáló sejteket vegyük figyelembe, lásd az 5.3.2. pontban.
- 5.3.6. A FISH-teszt eredményének kiértékelése:
- A FISH-teszt eredménye akkor érvényes, ha a *C. m. subsp. sepedonicus*-ra jellemző méretű és morfológiájú, élénkzöldön fluoreszkáló sejtek figyelhetők meg FITC-szűrő használatával és élénkvörösen fluoreszkáló sejtek a rodamin-szűrő használatával az összes pozitív kontrollnál, viszont a negatív kontrollok egyikénél sem. Ha találunk élénken fluoreszkáló, jellegzetes morfológiájú sejteket, becsüljük meg a jellemző sejtek átlagos számát mikroszkóp látómezőnként, és számoljuk ki a jellemző sejtek számát az újraszuszpendált üledék 1 ml-ére (4. függelék). Azok a minták, amelyek legalább 5×10^3 jellemző sejtet tartalmaznak az újraszuszpendált üledék 1 ml-ében potenciálisan fertőzöttnek tekinthetők. További vizsgálat szükséges. Azok a minták, amelyek kevesebb, mint 5×10^3 jellemző sejtet tartalmaznak az újraszuszpendált üledék 1 ml-ében negatívnak tekinthetők.
 - A FISH-teszt negatív, ha a *C. m. subsp. sepedonicus*-ra jellemző méretű és morfológiájú, élénkvörösen fluoreszkáló sejtek nem figyelhetők meg rodamin-szűrő használatával, feltéve, hogy jellemző, élénkvörösen fluoreszkáló sejtek figyelhetők meg a pozitív kontrollkészítményekben rodamin-szűrő használatával.

6. PCR-TESZT

Az alapelvek

Amennyiben a PCR-tesztet elsőszámú szűrővizsgálatként használjuk, és pozitívnak bizonyul, akkor el kell végezni az izolálási vizsgálatot vagy az IF-tesztet második szűrővizsgálatként. Amennyiben a PCR-tesztet második szűrővizsgálatként használjuk, és pozitívnak bizonyul, további vizsgálatra van szükség a folyamatábrának megfelelően a diagnosztizálás befejezéséhez.

E módszer elsőszámú szűrővizsgálatként történő teljes körű felhasználása csak akkor ajánlott, ha a szükséges specifikus szakmai ismeretek elsajátításra kerültek.

Megjegyzés:

Az e módszerrel végzett előzetes vizsgálatnak lehetővé kell tennie a korábbi vizsgálatok szerint negatív mintakivonatokhoz adott 10^3 – 10^4 /ml *C. m. subsp. sepedonicus* sejt reprodukálható kimutatását. Optimalizálási kísérletekre lehet szükség a maximális érzékenység és specifikusság eléréséhez minden laboratóriumban.

Használjunk validált PCR reagenseket és protokollokat. Lehetőleg belső kontrollal rendelkező módszert válasszunk.

Tegyük meg a megfelelő óvintézkedéseket annak érdekében, hogy elkerüljük a minta befertőződését a cél DNS-sel. A PCR-tesztet gyakorlott technikuskoknak kell végezniük erre szolgáló molekuláris biológiai laboratóriumokban, hogy minimalizáljuk a cél DNS-sel való fertőződés veszélyét.

A negatív kontrollokat mindig (DNS-kivonás és PCR) úgy kell kezelni, mint végső mintákat az eljárás során, hogy nyilvánvaló legyen, vajon történt-e DNS átvitel.

A következő negatív kontrollokat kell alkalmazni a PCR-tesztnél:

- Mintakivonat, amelyet előzőleg megvizsgáltak és a *C. m. subsp. sepedonicus*-ra negatívnak bizonyult.
- Puffer kontrollok, amelyeket a baktérium és a DNS mintából történő kivonására használnak.
- PCR-reakcióelegy.

A következő pozitív kontrollokat kell alkalmazni:

- Újraszuspendált üledék, melyhez *C. m. subsp. sepedonicus* került hozzáadásra (elkészítését lásd a 2. függelékben).
- Egy virulens izolátumból származó 10^6 /ml *C. m. subsp. sepedonicus* sejt szuszpenziója vízben (pl. NCPPB 2140 vagy NCPPB 4053).
- Ha lehetséges, használjunk a pozitív kontroll mintákból származó DNS-t is a PCR-vizsgálat során.

A lehetséges befertőzések elkerülése érdekében a pozitív kontrollokat a vizsgálandó mintáktól különálló környezetben készítsük el.

A mintakivonatokat amennyire csak lehetséges, legyenek mentesek a talajtól. Ezért ajánlatos lehet megmosott burgonyából készíteni a kivonatokat, amikor PCR-protokollok kerülnek alkalmazásra.

6.1. DNS-tisztítási módszerek

Használjuk a fentiekben leírt pozitív és negatív kontrollmintákat.

Vizsgáljuk a kontrollanyagot a mintával/mintákkal azonos módon.

Különböző módszerek állnak rendelkezésre a cél DNS megtisztítására a komplex minta szubsztrátumoktól, melyek eltávolítják a PCR és más enzimes reakciók inhibitorait, és koncentrálnak a cél DNS-t a mintakivonatban.

A következő módszer lett optimalizálva a 6. függelékben bemutatott validált PCR-módszernél történő felhasználásra.

6.1. a) A Pastrik-féle módszer (2000):

1. Pipettázzunk 220 µl lízis-puffert (100 mM NaCl, 10 mM tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) egy 1,5 ml-es Eppendorf-csőbe.
2. Adjunk hozzá 100 µl mintakivonatot, és helyezzük egy hevítő blokkba vagy vízfürdőbe 95 °C-ra 10 percig.
3. Tegyük a csövet jégre 5 percre.
4. Adjunk hozzá 80 µl lizozim törzssoldatot (50 mg/ml lizozim 10 mM-os tris-HCl-ben, pH 8,0), és inkubáljuk 37 °C-on 30 percig.
5. Adjunk hozzá 220 µl Easy DNA[®] A oldatot (Invitrogen), vortex-szel jól keverjük össze, és inkubáljuk 65 °C-on 30 percig.

6. Adjunk hozzá 100 µl Easy DNA[®] B oldatot (Invitrogen), erőteljesen vortex-szeljük, amíg a csapadék már szabadon mozog a csőben, és a minta egyenletesen viszkózus lesz.
7. Adjunk hozzá 500 µl kloroformot, és vortex-szeljük, amíg a viszkozitás csökken, és az elegy homogénvé válik.
8. Centrifugáljuk 15 000 g-vel 20 percig 4 °C-on, hogy a fázisok elkülönüljenek, és kialakuljon az interfázis.
9. Vigyük át a felső fázist egy új Eppendorf-csőbe.
10. Adjunk hozzá 1 ml 100 %-os etil-alkoholt (– 20 °C) rövid ideig vortex-szeljük, és inkubáljuk jégen 10 percig.
11. Centrifugáljuk 15 000 g-vel 20 percig 4 °C-on, és távolítsuk el az etil-alkoholt a üledékről.
12. Adjunk hozzá 500 µl 80 %-os etil-alkoholt (– 20 °C), és keverjük össze a cső átforgatásával.
13. Centrifugáljuk 15 000 g-vel 10 percig 4 °C-on, örzizzük meg a üledéket, és távolítsuk el az etil-alkoholt.
14. Hagyjuk a üledéket megszáradni a levegőn vagy egy gyors DNS vákuumszáritóban.
15. Szuszpendáljuk újra azüledéket 100 µl steril UPW-ben, és hagyjuk szobahőmérsékleten legalább 20 percig.
16. Tároljuk – 20 °C-on amíg a PCR-hez szükség lesz rá.
17. Centrifugálással ülepsük le a fehér csapadékot, és vegyünk 5 µl-t a DNS-t tartalmazó felülúszó folyadékból a PCR-hez.

6.1. b) Egyéb módszerek

Egyéb DNS kivonási módszerek, pl. a Qiagen DNeasy Plant Kit is alkalmazhatók, feltéve, hogy bizonyítottan ugyanennyire hatékonyan végzik a DNS-tisztítást 10^3 – 10^4 /ml kórokozó sejtet tartalmazó kontroll mintákból.

6.2. PCR

- 6.2.1. Készítsünk teszt és kontroll templátokat a PCR-hez a validált protokolloknak megfelelően (6. függelék). Készítsünk tízszeres hígítást a minta DNS-kivonatból (1:10 UPW-ben).
- 6.2.2. Készítsük el a megfelelő PCR reakcióelegyet fertőzéstmentes környezetben a közzétett protokollok szerint (6. függelék). Amennyiben lehetséges, ajánlatos a multiplex PCR-protokoll használata, amely magában foglal egy belső PCR-kontrollt is.
- 6.2.3. Adjunk 5 µl DNS-kivonatot 25 µl PCR reakcióegyhez steril PCR-csőekben.
- 6.2.4. Vonjunk be egy negatív kontroll mintát, amely csak PCR reakcióelegyet tartalmaz, és adjunk hozzá UPW-t, mely ugyanabból a forrásból származzon, mint amit a PCR reakcióegyben a minta helyén használtunk.
- 6.2.5. Helyezzük a csöveket ugyanabba a thermal cycler-be, melyet az előzetes vizsgálat során használtunk, és futtassuk le a megfelelően optimalizált PCR-programot (6. függelék).

6.3. A PCR termék elemzése

- 6.3.1. Elemezzük a PCR-fragmentumokat agarózgél-elektroforézissel. Futtassunk legalább 12 µl felszaporított DNS reakcióelegyet mindegyik mintából, 3 µl betöltőpufferrel keverve (6. függelék) 2,0 %-os (m/v) agarózgélben tris-acetát-EDTA (TAE) pufferben (6. függelék) 5–8 V/cm-en. Használjunk megfelelő DNS markert, pl. 100 bp ladder-t.
- 6.3.2. Fessük a DNS láncokat etidium-bromiddal (0,5 mg/liter) 30–45 percig, kellő óvintézkedések mellett dolgozzunk ezzel a mutagénnel.
- 6.3.3. Tanulmányozzuk a megfestett gélt rövidhullámú UV átvilágítás ($\lambda = 302$ nm) mellett a várható méretű felerősített PCR termékekre nézve (6. függelék), és dokumentáljuk.

- 6.3.4. Minden új leletnél/esetnél igazoljuk a PCR-fragmentum hitelességét restrikciós enzimanalízissel, melyet a maradék felszaporított DNS-ből származó mintán végezzünk el optimális hőmérsékleten és ideig inkubálva a megfelelő enzimmel és pufferrel (lásd a 6. függeléket). Elemezzük a feltárt fragmentumokat agarózgél-elektroforézissel, mint korábban, és tanulmányozzuk a jellegzetes restrikciós fragmentum mintázatot UV átvilágítás mellett etidiumbromid festés után, és hasonlítsuk össze a feltáratlan és a feltárt pozitív kontrollal.

A PCR-teszt eredményeinek kiértékelése:

A PCR-teszt negatív, ha a *C. m. subsp. sepedonicus*-specifikus várható méretű PCR-fragmentum nem mutatható ki a kérdéses mintában, viszont kimutatható valamennyi pozitív kontroll mintában (a belső kontroll primerekkel végzett multiplex PCR esetében: egy második várható méretű PCR-terméket kell felerősíteni a kérdéses mintával együtt).

A PCR-teszt pozitív, ha a *C. m. subsp. sepedonicus*-specifikus várható méretű PCR-fragmentum és (amennyiben szükséges) a restrikciós mintázat kimutatható, feltéve, hogy az nem erősödött fel valamelyik negatív kontroll mintától. A pozitív eredmény megbízható megerősítése elérhető a vizsgálat megismétlésével a PCR primerek második sorozatán (9.3. szakasz).

Megjegyzés:

A PCR gátlása gyanítható, ha a várható fragmentumot nyerjük a vízben lévő *C. m. subsp. sepedonicus*-t tartalmazó pozitív kontroll mintából, viszont negatív eredményeket kapunk a burgonyakivonatban lévő *C. m. subsp. sepedonicus*-t tartalmazó pozitív kontrollból. A belső PCR kontrollal rendelkező multiplex PCR-protokollokban jelzik a reakció gátlását, ha a két fragmentum egyike sem kerül kinyerésre.

Gyanítható a fertőzés, ha a várható fragmentumot nyerjük egy vagy több negatív kontrollból.

7. BIOLÓGIAI TESZTELÉSI VIZSGÁLAT

Megjegyzés:

Az ezzel a módszerrel végzett előzetes vizsgálatnak lehetővé kell tennie a korábbi vizsgálatokban negatívnak bizonyult mintakivonatokhoz (elkészítését lásd a 2. függelékben) adott 10^3 – 10^4 /ml *C. m. subsp. sepedonicus* telepalkotó egység reprodukálható kimutatását.

A kimutatás érzékenysége várhatóan akkor lesz a legmagasabb, ha frissen készített mintakivonatot használunk, és optimális szaporodási feltételeket biztosítunk. A módszert azonban sikeresen lehet alkalmazni olyan kivonaton, amelyeket glicerinnel – 68 és – 86 °C között tároltunk.

Néhány tojásgyümölcs-fajta kiváló szelektív dúsítási táptalajt jelent a *C. m. subsp. sepedonicus* szaporodásához még a tünetek hiányában is, és ugyancsak kiváló megerősítő gazdanövény-vizsgálatra ad lehetőséget.

A szaporodási feltételeknek optimálisnak kell lenniük a hamis negatív vizsgálati eredmények kockázatának csökkentése érdekében.

A növénynevelés részleteit lásd a 8. függelékben.

- 7.1. Osszuk el teljes egészében az újrászuszpendált üledék vizsgálati mennyiségeinek a 3.1.6. és a 3.2.5. szakaszban megmaradó részét a tojásgyümölcs-növények között az alábbiakban megadott módszerek egyikével (7.3. vagy 7.4.). 2-3 leveles növényeket használjunk, a harmadik valódi levél teljes kifejlődéséig. Az újrászuszpendált üledék teljes hasznosításának biztosítása, valamint a hatékony beoltás érdekében az alábbiakban felvázolt eljáráshoz 15–25 tojásgyümölcs-növényre lesz szükség mintánként.
- 7.2. Ne öntözzük a tojásgyümölcs-növényeket 1–2 napig a beoltást megelőzően a turgornyomás csökkentése érdekében.
- 7.3. Bemetszéses beoltás
- 7.3.1. Két ujjunk között tartva a növényt, pipettázzunk egy csepp (mintegy 5–10 µl) szuszpendált üledéket a szárra a sziklevelek és az első levél közé.
- 7.3.2. Steril szikével ejtsünk átlós bemetszést, amely mintegy 1,0 cm hosszú és a mélysége körülbelül a szárvastagság 2/3-a, a vágás a üledékcepptől induljon.
- 7.3.3. Zárjuk le a bevágást fecskendőből kinyomott steril vazelinrel.

7.4. Befecskendezéses beoltás

Oltsuk be a tojásgyümölcs-növények szárát közvetlenül a sziklevek felett injekciós tűvel ellátott fecskendővel (legalább 23G). Osszuk el a mintát a tojásgyümölcs-növények között.

7.5. Pozitív kontrollként oltsunk be ugyanazzal a beoltási módszerrel (7.3. vagy 7.4.) 5 növényt egy ismert *C. m. subsp. sepedonicus* tenyészet 10^5 – 10^6 /ml sejtet tartalmazó vizes szuszpenziójával, és – amennyiben lehetséges – természetesen fertőződött gumó szövettel (lásd a 4. szakaszt).

7.6. Negatív kontrollként oltsunk be ugyanazzal a beoltási módszerrel (7.3. vagy 7.4.) 5 növényt steril üledékpufferrel.

7.7. Inkubáljuk a növényeket növény-egészségügyi zárlati létesítményekben 4 héten keresztül 18–24 °C-on, elegendő fény és magas relatív páratartalom (70–80 %) mellett, valamint a megfelelő öntözés biztosításával, hogy megelőzzük a vízzel való átitatódást, vagy a vízhiány okozta hervadást. A *C. m. sepedonicus* sejtek elpusztulnak 30 °C felett, az optimális hőmérséklet pedig 21 °C. A fertőzések elkerülése érdekében inkubáljuk a pozitív és a negatív kontrollnövényeket jól elkülönített padokon, üvegházban vagy nevelő kamrában, abban az esetben, ha a tér korlátozott, biztosítani kell a kezelések közötti szigorú elkülönítést. Ha az eltérő mintákhoz tartozó növényeket egymás közelében kell inkubálni, különítsük őket el egymástól megfelelő válaszfallal. A műtrágyázásnál, az öntözésnél, a szemrevételezésnél és minden más beavatkozásnál fordítsunk kiemelt figyelmet a keresztbe fertőződés elkerülésére. Alapvető fontosságú, hogy az üvegházat és a nevelő kamrát a rovarkárttevőktől mentesen tartsuk, mivel azok átvihetik a baktériumot egyik mintáról a másikra.7.8. Rendszeresen ellenőrizzük az egy hét elteltével megjelenő tüneteket. Számoljuk meg a tüneteket mutató növényeket. A *C. m. subsp. sepedonicus* a levelek hervadását okozza a tojásgyümölcs-növényeknél, amely kezdődhet levélszéli vagy levélerek közötti petyhüdséggel. A hervadt szövet kezdetben sötétzöld vagy foltos lehet, de elhalványul mielőtt nekrotikussá válna. A levélerek közötti hervadt szövetek gyakran zsírosnak és vízzel átitatottnak tűnnek. A nekrotikus szövet széle gyakran világossárga. A növények nem feltétlenül pusztulnak el; minél hosszabb idő telik el a tünetek megjelenéséig, annál nagyobb az esélyük a túlélésre. A növények kinőhetnek a fertőzést. A fiatal tojásgyümölcs-növények sokkal fogékonyabbak a *C. m. subsp. sepedonicus* gyér populációira, mint az idősebb növények, ezért szükséges 3 leveles állapotban vagy közvetlenül az előtt lévő növényeket használni.

A hervadást a gumószövet-üledékben található más baktériumok vagy gombák populációi is kiválthatják. Ezek közé tartozik a *Ralstonia solanacearum*, az *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* és az *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, az *Erwinia chrysanthemi*, a *Phoma exigua* var. *foveata*, valamint a szaprofita baktériumok népes populációi. Különösen az *Erwinia chrysanthemi* okozhat a *C. m. sepedonicus* tüneteihez nagyon hasonló levéltüneteket és hervadást. Az egyetlen különbség az, hogy az *Erwinia chrysanthemi* által okozott fertőzések esetében a szár elfeketedik. Az egyéb hervadásokat meg lehet különböztetni a *C. m. subsp. sepedonicus* által okozottaktól, mivel egész levelek vagy egész növények gyorsan elhervadnak. Gram-festést is lehet végezni: ezzel a vizsgálattal meg lehet különböztetni a *C. m. subsp. sepedonicus*-t az *Erwinia*-fajoktól.

7.9. Amint a tünetek megjelennek a tojásgyümölcs-növényeken, el kell végezni az újraizolálást a növényekből vett hervadt levélszövet vagy szárszövet felhasználásával (lásd a szövetmacerációs eljárást a 3.1.3. pontban). Fertőtlenítsük a tojásgyümölcs-növény leveleit és szárait 70 %-os etil-alkohollal való letörléssel. Végezzünk IF-tesztet vagy PCR-t a tojásgyümölcs nedvén, és izoláljuk megfelelő (szelektív) táptalajra (lásd a 8. szakaszt). A Gram-festést (9. függelék) is el lehet végezni. Azonosítsuk a vélelmezett *C. m. subsp. sepedonicus* megtisztított tenyészeit, és igazoljuk a patogenitást (lásd a 9. és 10. szakaszt).7.10. Bizonyos körülmények között, különösen, amikor a szaporodási feltételek nem optimálisak, lehetséges lehet, hogy a *C. m. subsp. sepedonicus* látens fertőzés formájában létezen a tojásgyümölcs-növényekben még 4 hetes inkubálási időszak után is. Ha 4 hét után nem figyelhetők meg tünetek, akkor végezzünk IF-/PCR-vizsgálatot az egyes teszt növények szárának a beoltás helye feletti részéről vett 1 cm-es darabokból álló összetett mintán. Ha a vizsgálat pozitív, újraizolálást kell végezni megfelelő (szelektív) táptalajon a 8. szakaszban leírt eljárást követően. Azonosítsuk a vélelmezett *C. m. subsp. sepedonicus* megtisztított tenyészeit, és igazoljuk a patogenitást (9. és 10. szakasz).

A biológiai tesztelési vizsgálat eredményeinek kiértékelése

Érvényes biológiai tesztelési vizsgálati eredményeket akkor kapunk, ha a pozitív kontrollnövények jellemző tüneteket mutatnak, a baktériumokat újra lehet izolálni ezekről a növényekről, és a negatív kontrollokon nem találhatók tünetek.

A biológiai tesztelési vizsgálat negatív, ha a teszt növények nem fertőződtek *C. m. subsp. sepedonicus*-szal, és feltevé, hogy az *C. m. subsp. sepedonicus* kimutatható a pozitív kontrollokon.

A biológiai tesztelési vizsgálat pozitív, ha a teszt növények fertőződtek *C. m. subsp. sepedonicus*-szal.

8. A C. M. SUBSP. *SEPEDONICUS* IZOLÁLÁSA*Megjegyzés:*

A diagnosztizálás csak akkor fejeződik be, ha a C. m. subsp. *sepedonicus* izolálásra, majd azonosításra kerül (lásd a 9. szakaszt), amit a patogenitás vizsgálat megerősít (10. szakasz). Bár a C. m. subsp. *sepedonicus* válogatós károsító, tüneteket mutató szövetből izolálható.

Azonban növekedésben leghatékonyabb a gyorsan szaporodó szaprofita baktériumok, és ezért izolálása közvetlenül gumó- vagy szárszövet üledékéből (3.1.6. vagy 3.2.5. szakasz) nehéz. Szelektív táptalajon és a köldökrészből vett darabokból vagy a szárdarabokból származó, újraszuszpendált üledék megfelelő hígításával a C. m. subsp. *sepedonicus* közvetlen izolálása lehetséges lehet.

Az izolálást tüneteket mutató burgonyagumókból vagy szárdarabokból kell elvégezni, valamint tojásgyümölcs-növényekből, ha tünetek nem figyelhetők meg, de az összetett mintán végzett IF-/PCR-vizsgálat pozitív volt (lásd a 7.10. szakaszt). A tojásgyümölcs-növények szárainak macerálását – szükség esetén – a 3.1.3. szakaszban leírtak szerint kell elvégezni.

Pozitív kontrollként készítsünk tízszeres hígításokat C. m. subsp. *sepedonicus* 10⁶ cfu/ml-es szuszpenziójából (pl. NCPPB 4053 vagy PD 406). A fertőzés lehetőségének elkerülése érdekében, a pozitív kontrollokat a vizsgálandó mintáktól teljesen elkülönítve készítsük el.

A szelektív táptalaj minden egyes újonnan elkészített tételénél meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő-e a kórokozó szaporodása szempontjából, mielőtt a rutin minták vizsgálatánál felhasználásra kerülne.

A kontrollanyagot a mintával/mintákkal azonos módon vizsgáljuk.

8.1. **Szelektív lemeztenyésztés**

8.1.1. Újraszuszpendált burgonyakivonat-minta vagy tojásgyümölcs-növény nedv 100 µl-nyi mennyiségéből készítsünk 10-szeres hígításokat üledékpufferben (3. függelék).

8.1.2. A hígítatlan burgonyaüledékből végzett izolálás rendszerint sikertelen a Cms nehezen kielégíthető szaporodási szokásai és a szaprofiták által okozott verseny következtében. Mivel a baktérium általában népes populációkban van jelen a fertőzött szövetekben, a szaprofitákat általában ki lehet hígítani, miközben a patogén megmarad. Ezért ajánlatos 100 µl-t széleszteni mindegyik mintából, 1/100-astól egészen 1/10 000-es hígításig MTNA táptalajra vagy NCP-88 táptalajra (5. függelék) (ha 90 mm átmérőjű Petri-csészéket használunk, akkor igazítsuk hozzá a térfogatot az alternatív csészemérethez), szélesztőbot (jégshokibot) és szélesztéses lemeztenyésztési technika felhasználásával.

Megjegyzés:

Alternatív stratégiát az jelent, ha a burgonyaüledék kezdeti 100 µl aliquot térfogatát szélesztjük az első agarlemezre a szélesztő-kengyellel, majd a szélesztőkengyelt továbbvisszük a második agarlemezre, ahol szétkenjük a kengyelen maradt maradékot; végül ugyanezt megismételjük a harmadik lemezzel, így a hígításos lemeztenyésztésnek megfelelő hatást érünk el a szélesztőkengyellel.

8.1.3. Inkubáljuk a lemezeket sötétben 21–23 °C-on.

8.1.4. A lemezek első vizsgálatára, beleértve – a kontroll-lemezekhez való viszonyítással – a C. m. subsp. *sepedonicus*-szerű telepek megszámlálását, 3 nap után kerül sor, amit további számlálás követ 5, 7, és végül 10 nap után.

8.2. **A gyanús telepek tisztítása***Megjegyzés:*

A C. m. subsp. *sepedonicus*-szerű telepek szubkultúráit YGM táptalajon kell létrehozni a tojásgyümölcs-növények beoltásához és/vagy a későbbi azonosításhoz; ezt a lemezek túlzott túlszaporodottá válása előtt kell elvégezni, vagyis lehetőleg 3–5 nap után.

8.2.1. Szélesszük kacsával a C. m. subsp. *sepedonicus*-szerű telepeket a következő táptalajok egyikére: (összetételüket lásd az 5. függelékben):

dextróz-tápagar (kizárólag a szubkultúránál történő felhasználásra),

élesztő-pepton-glükóz agar,

élesztőkivonat-ásványi só agar.

Inkubáljuk 21–24 °C-on 10 napig.

A *C. m. subsp. sepedonicus* lassan szaporodik, általában 10 napon belül hozza létre gombostűfejnyi, krémszínű, domború telepeit. (A *C. m. subsp. sepedonicus* jellegzetes telepeinek fényképei megtalálhatók a honlapon: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

8.2.2. Újraszélesztés kaccsal a tisztaság elérése céljából

A szubkultúrával javul a szaporodási ráta. A jellegzetes telepek krémfehérek vagy elefántcsontszínűek, alkalmanként sárgák, kerek, simák, kiemelkedők, konvex domborúak, nyálkás-folyósak, ép szélekkel és az átmérőjük rendszerint 1–3 mm.

Egy egyszerű Gram-festés (9. függelék) segíthet a telepek kiválasztásában a további vizsgálathoz.

8.2.3. Azonosítsuk a vélelmezett tenyészeteket (lásd a 9. szakaszt), és végezzük el a patogenitás vizsgálatot (lásd a 10. szakaszt).

9. AZONOSÍTÁS

Azonosítsuk a vélelmezett *C. m. subsp. sepedonicus* izolátumok tiszta tenyészeit az alábbiak közül legalább két – eltérő biológiai elveken alapuló – vizsgálat felhasználásával.

Használjunk ismert referencia törzseket – amennyiben helyénvaló – mindegyik elvégzett vizsgálatnál.

9.1. Tápanyaghasznosítási és enzimes azonosítási vizsgálat

Határozzuk meg a következő fenotípusos jellemzőket – amelyek általánosan megfigyelhetők vagy nem találhatók meg a *C. m. subsp. sepedonicus*-nál – Lelliott és Stead (1987), Klement *et al.* (1990), Schaad (2001), Anonymous (1987) módszerei szerint.

Valamennyi táptalajt inkubálni kell 21 °C-on, és meg kell vizsgálni hat nap elteltével. Ha nincs növekedés, akkor inkubáljuk 20 napon át.

Minden vizsgálatba be kell vonni egy ismert *C. m. subsp. sepedonicus* kontrollt. A tápanyaghasznosítási és az élet-tani vizsgálatokat a tápagar szubkultúrákból vett inokulumok felhasználásával kell elvégezni. Morfológiai összehasonlításokat kell végezni a dextróz-tápagar tenyészetekből.

Vizsgálat	Várható eredmény
Oxidációs/Fermentációs (O/F) vizsgálat	Inaktív vagy gyengén oxidatív
Oxidáz-aktivitás	–
Szaporodás 37 °C-on	–
Ureáz-aktivitás	–
Eszkulin-hidrolízis	+
Keményítő-hidrolízis	– vagy gyenge
7 %-os NaCl tolerancia	–
Indolképződés	–
Kataláz-aktivitás	+
H ₂ S-képződés	–
Citrát-hasznosítás	–
Zselatin elfolyósítása	–
Savképződés glicerinnél	–
Savképződés laktózból	– vagy gyenge
Savképződés ramnózból	–
Savképződés szalicinnél	–
Gram-festés (9. függelék)	+

9.2. IF-teszt

- a) Készítsünk egy szuszpenziót, amely hozzávetőleg 10^6 /ml sejtet tartalmaz IF-pufferben (3. függelék).
- b) Készítsük el a megfelelő antiszérum kétszeres hígítási sorozatát.
- c) Végezzük el az IF eljárást (4. szakasz).
- d) Az IF-teszt pozitív, ha a tenyészet IF-titere egyenlő a pozitív kontrolléval.

9.3. PCR-teszt

- a) Készítsünk hozzávetőleg 10^6 /ml sejtet ultra tiszta vízben (UPW) tartalmazó szuszpenziót.
- b) Hevítsünk 100 μ l sejtuszuszpenziót lezárt csövekben hevítő blokkban vagy forrásban lévő vízfürdőben 100 °C-on 4 percig. Ha szükséges, frissen készített 0,05 M végkoncentrációjú NaOH hozzáadása segítheti a sejtbomlást. A mintákat ezután – 16 és – 24 °C között tárolhatjuk, amíg szükséges.
- c) Alkalmazzuk a megfelelő PCR-eljárásokat a *C. m. subsp. sepedonicus*-specifikus fragmentumok felszaporítására (pl. Pastrok, 2000; lásd a 4. függelék; Li és de Boer, 1995; Mills *et al.*, 1997; Pastrok és Rainey, 1999; Schaad *et al.*, 1999).
- d) A *C. m. subsp. sepedonicus* pozitív azonosítása megvalósul, ha a PCR fragmentumok azonos méretűek, és azonos restrikciós fragmentumhossz polimorfizmusokkal rendelkeznek, mint a pozitív kontrolltörzs esetében képződöttek.

9.4. FISH-teszt

- a) Készítsünk egy szuszpenziót, amely hozzávetőleg 10^6 /ml sejtet tartalmaz UPW-ben.
- b) Végezzük el a FISH-eljárást (5. szakasz).
- c) A FISH-teszt pozitív, ha ugyanazokat a reakciókat kapjuk a tenyészetnél és a pozitív kontrollnál.

9.5. Zsírsav meghatározás (FAP)

- a) Szaporítsuk a tenyészetet triptikáz-szója agaron (Oxoid) 72 órán át 21 °C-on (+/- 1°).
- b) Alkalmazzuk a megfelelő FAP eljárást (Janse, 1991; Stead, 1992).
- c) A FAP vizsgálat pozitív, ha a vélelmezett tenyészet profilja megegyezik a pozitív kontrolléval. A jellegzetes zsírsavak jelenléte, azaz 15:1 Anteiso A, 15:0 Iso, 15:0 Anteiso, 16:0 Iso, 16:0 és 17:0 Anteiso, erőteljesen a *C. m. sepedonicus*-ra utal. Más nemzetségek, mint például a *Curtobacterium*, az *Arthrobacter* és a *Micrococcus*, szintén rendelkeznek ezen savak némelyikével, de a 15:1 Anteiso A ritka ezekben a baktériumokban, viszont minden *Clavibacter* fajban megtalálható 1–5 %-ban. A *C. m. sepedonicus* esetében ez az érték általában 5 % körüli.

9.6. BOX-PCR

- a) Készítsünk egy szuszpenziót, amely hozzávetőleg 10^6 /ml sejtet tartalmaz UPW-ben.
- b) Végezzük el a vizsgálatot az eljárás szerint (Smith *et al.*, 2001).

10. MEGERŐSÍTŐ VIZSGÁLAT

A patogenitás vizsgálatot el kell végezni a *C. m. subsp. sepedonicus* diagnosztizálásának végső megerősítésére, és a *C. m. subsp. sepedonicus*-ként azonosított tenyészetek virulenciájának felmérésére.

- 10.1. Készítsünk a vizsgálandó izolátum 3 napos tenyészetéből hozzávetőleg 10^6 /ml sejtet tartalmazó oltóanyagot, és egy *C. m. subsp. sepedonicus* törzsből megfelelő pozitív kontrollt.

- 10.2. Oltsuk be 5–10 fiatal, 3 leveles korban lévő tojásgyümölcs-palánta szárát (7.3. vagy 7.4. szakasz).
- 10.3. Inkubáljuk 18–24 °C-on elegendő fény és magas relatív páratartalom mellett, valamint a megfelelő öntözés biztosításával, hogy megelőzzük a vízzel való átitatódást, vagy a szárazság okozta stresszt (7.7. szakasz). A tiszta tenyészeteknél a tipikus hervadásnak 2 héten belül be kell következnie, de azokat a növényeket, amelyek nem mutatkoznak tünetek (lásd a 7.8. szakaszt) ezen időszak letelte után, inkubálni kell 3 héten át a tojásgyümölcs növekedését elősegítő hőmérsékleten, amely nem haladhatja meg a 25 °C-ot (8. függelék). Ha 3 hét után nem mutatkoznak tünetek, akkor nem lehet megerősíteni, hogy a tenyészet a *C. m. subsp. sepedonicus* patogén formája.
- 10.4. Izoláljunk a tüneteket mutató növényekből a szár egy darabjának a beoltási pont felett mintegy 2 cm-rel történő eltávolításával. Zúzzuk össze és szuszpendáljuk kis mennyiségű steril desztillált vízben vagy 50 mM foszfát-pufferben (3. függelék). Izoláljuk a szuszpenzióból kengyellel vagy kaccsal végzett hígítással MTNA vagy YPGA táptalajra (5. függelék), inkubáljuk 3–5 napon át 21–23 °C-on, és figyeljük meg a *C. m. subsp. sepedonicus*-ra jellemző telepek kialakulását.

1. függelék

A protokollok optimalizálásába és validálásába bevont laboratóriumok

Laboratórium ⁽¹⁾	Település	Ország
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Bécs és Linz	Ausztria
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Belgium
Plantedirektoratet	Lyngby	Dánia
Central Science Laboratory	York	Anglia
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburgh	Skócia
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	Franciaország
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Franciaország
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Németország
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Németország
State Laboratory	Dublin	Írország
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Hollandia
Norwegian Crop Research Institute, Plant Protection Centre	Aas	Norvégia
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lisszabon	Portugália
Nacionalni institut za biologijo	Ljubljana	Szlovénia
Centro de Diagnóstico de Aldearrubia	Salamanca	Spanyolország

⁽¹⁾ Kapcsolattartó kutatók: lásd a honlapot <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

2. függelék

A pozitív és a negatív kontrollok elkészítése az alapvető szűrővizsgálatokhoz: a PCR/IF- és a FISH-teszthez

Készítsünk 72 órás tenyészetet a *C. m. subsp. sepedonicus* egy virulens törzséből (NCPPB 4053 vagy 406) alap MTNA táptalajon, és szuszpendáljuk 10 mM foszfát-pufferben, hogy hozzávetőleg $1-2 \times 10^8$ cfu/ml sejtsűrűséget kapjunk. Ezt rendszerint kissé zavaros szuszpenzióval érjük el, amely 0,2-es optikai sűrűségnek felel meg 600 nm-nél.

Távolítsuk el a köldökrész egy darabját 200 burgonyagumóból, melyek egy fehér héjú fajtából származnak, és ismeretes, hogy mentesek a *C. m. subsp. sepedonicus*-tól.

Dolgozzuk fel a köldökrészeket a szokásos módon, és szuszpendáljuk újra a üledéket 10 ml-ben.

Készítsünk 10 steril 1,5 ml-es mikrocsovet 900 µl újraszuszpendált üledékkel.

Vigyük 100 µl *C. m. subsp. sepedonicus* szuszpenziót az első mikrocsoőbe. Vortex-szel keverjük össze.

Hozzuk létre a fertőzés tizedes szintjeit további hígítással a következő öt mikrocsoőben.

A hat fertőzött mikrocsoövet pozitív kontrollként fogjuk használni. A négy nem fertőzött mikrocsoövet negatív kontrollként fogjuk használni. Ennek megfelelően címkézzük a mikrocsoőveket.

Készítsünk 100 µl mennyiségeket steril 1,5 ml-es mikrocsoővekben, így 9 ismétlést alakítva ki mindegyik kontrollmintából. Tároljuk – 16 és – 24 °C között a felhasználásig.

Az *C. m. subsp. sepedonicus* jelenlétét és kvantifikálását a kontrollmintákban először IF-teszttel kell megerősíteni.

A PCR-teszthez végezzünk DNS-kivonást a pozitív és a negatív kontrollmintákból minden egyes vizsgálatiminta-sorozat esetében.

Az IF- és a FISH-tesztekhez végezzünk vizsgálatokat a pozitív és a negatív kontrollmintákon minden egyes vizsgálatiminta-sorozattal.

Az IF-, a FISH- és a PCR-vizsgálatokhoz a *C. m. subsp. sepedonicus*-t legalább 10^6 és 10^4 sejt/ml koncentrációban kell kimutatni a pozitív kontrollokban, és a negatív kontrollok egyikében sem szabad, hogy kimutatható legyen.

3. függelék

Pufferek a vizsgálati eljárásokhoz.

ÁLTALÁNOS: A felbontatlan sterilizált puffereket egy évig lehet tárolni.

1. Pufferek a kivonási eljáráshoz**1.1. Kivonó-puffer (50 mM foszfát- puffer, pH 7,0)**

Ez a puffer a baktériumnak a növényi szövetekből homogenizálás vagy rázás útján történő kivonására szolgál.

Na ₂ HPO ₄ (vízmentes)	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
Desztillált víz	1,00 liter

Oldjuk fel az összetevőket, ellenőrizzük a pH-t és sterilizáljuk autoklávban 121 °C-on 15 percig.

Az alábbi kiegészítő összetevők hasznosak lehetnek:

	Rendeltetés	Mennyiség (literenként)
Lubrol-pelyhek	Diszpergálószer (*)	0,5 g
DC Silicone habzágatló	Habzágatló anyag (*)	1,0 ml
Tetranátrium-pirofoszfát	Antioxidáns	1,0 g
Polivinilpirolidon-40 000 (PVP-40)	PCR inhibitorok megkötése	50 g

(*) A homogenizálással végzett kivonási módszerhez

1.2. Üledék-puffer (10 mM foszfát-puffer, pH 7,2)

Ez a puffer a burgonyagumók köldökrészéből vett darabok kivonatainak újraszuszpendálására és hígítására szolgál a üledék centrifugálással végzett koncentrálása után.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,4 g
Desztillált víz	1,00 liter

Oldjuk fel az összetevőket, ellenőrizzük a pH-t és sterilizáljuk autoklávban 121 °C-on 15 percig.

2. Pufferek az IF-teszthez**2.1. IF-puffer (10 mM foszfát-pufferes sóoldat (PBS), pH 7,2)**

Ez a puffer az ellenanyagok hígítására szolgál.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,4 g
NaCl	8,0 g
Desztillált víz	1,0 liter

Oldjuk fel az összetevőket, ellenőrizzük a pH-t és sterilizáljuk autoklávban 121 °C-on 15 percig.

2.2. IF-puffer-Tween

Ez a puffer a lemezek mosására szolgál.

Adjunk 0,1 %-os Tween 20-at az IF-pufferhez.

2.3. Foszfát-pufferes glicerin, pH 7,6

Ez a puffer fedő folyadékként szolgál az IF-lemezek ablakain a fluoreszcencia megnöveléséhez.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	3,2 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,15 g
Glicerin	50 ml
Desztillált víz	100 ml

Az elhalványulás elleni „ragasztó” oldatok kereskedelmi forgalomban kaphatók pl. Vectashield® (Vector Laboratories) vagy Citifluor® (Leica).

4. függelék

A fertőzöttségi szint meghatározása az IF- és a FISH-tesztben

1. Állapítsuk meg a jellemzően fluoreszkáló sejtek számának középértékét látómezőnként (c).
2. Számítsuk ki a jellemzően fluoreszkáló sejtek számát tárgylemez ablakonként (C)

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

ahol S = az ablak területe a több mintahelyes lemezen és

s = az objektív látómezőjének területe

$$s = \pi^2 / 4G^2K^2 \quad \text{ahol} \quad i = \text{látómező koeficiens (az okulár típusától függően 8–24 között változik)}$$

K = cső koeficiens (1 vagy 1,25)

G = az objektív nagyítása (100x, 40x stb.)

3. Számítsuk ki a jellemzően fluoreszkáló sejtek számát 1 ml újrászuszpendált üledékben (N)

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

ahol y = az újrászuszpendált üledék térfogata az egyes ablakokban és

F = az újrászuszpendált üledék hígítási tényezője.

5. függelék

A *C. m. subsp. sepedonicus* izolálására és tenyésztésére szolgáló táptalajok

a) Általános táptalajok

Tápagar (NA)

Tápagar (Difco)	23,0 g
Desztillált víz	1,0 liter

Oldjuk fel az összetevőket, és sterilizáljuk autoklávban 121 °C-on 15 percig.

Dextróz-tápagar (NDA)

Difco bacto tápagar, amely 1 % D(+)-glükózt (monohidrát) tartalmaz. Sterilizáljuk autoklávban 115 °C-on 20 percig.

Élesztő-pepton-glükóz agar (YPGA)

Élesztőkivonat (Difco)	5,0 g
Bacto-pepton (Difco)	5,0 g
D(+)-glükóz (monohidrát)	10,0 g
Bacto-agar (Difco)	15,0 g
Desztillált víz	1,0 liter

Oldjuk fel az összetevőket, és sterilizáljuk autoklávban 121 °C-on 15 percig.

Élesztőkivonat-ásványi sók táptalaj (YGM)

Bacto-élesztőkivonat (Difco)	2,0 g
D(+)-glükóz (monohidrát)	2,5 g
K ₂ HPO ₄	0,25 g
KH ₂ PO ₄	0,25 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,015 g
NaCl	0,05 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,005 g
Bacto-agar (Difco)	18 g
Desztillált víz	1,0 liter

Oldjuk fel az összetevőket, és sterilizáljuk a táptalaj 0,5 literes térfogatait autoklávban 115 °C-on 20 percig.

b) Validált szelektív táptalajok

MTNA táptalaj

Ha csak nincs más feltüntetve, valamennyi táptalaj összetevő a BDH-től került beszerzésre.

Élesztőkivonat (Difco)	2,0 g
Mannitol	2,5 g
K ₂ HPO ₄	0,25 g

KH_2PO_4	0,25 g
NaCl	0,05 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,015 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,005 g
Agar (Oxoid No. 1)	16,0 g
Desztillált víz	1,0 liter

Oldjuk fel az összetevőket, állítsuk be a pH-t 7,2-re. Autoklávozás (121 °C-on 15 percig) és 50 °C-ra történő lehűtés után adjuk hozzá az antibiotikumokat: trimetoprim 0,06 g, nalidixinsav 0,002 g, amfotericin B 0,01 g.

Készítsünk antibiotikum törzsoldatokat: trimetoprim (Sigma) és nalidixinsav (Sigma) (mindkettőből 5 mg/ml), 96 %-os metil-alkoholban, amfotericin B (Sigma) (1 mg/ml) dimetil- szulfoxidban. A törzsoldatokat szűréssel sterilizáljuk.

Megjegyzés:

Az alap táptalaj eltarthatósága 3 hónap. Az antibiotikumok hozzáadása után az eltarthatóság 1 hónap hűtőszekrényben való tárolás esetén.

NCP-88 táptalaj

Tápagar (Difco)	23 g
Élesztő kivonat (Difco)	2 g
D-mannitol	5 g
K_2HPO_4	2 g
KH_2PO_4	0,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25 g
Desztillált víz	1,0 liter

Oldjuk fel az összetevőket, állítsuk be a pH-t 7,2-re. Autoklávozás és 50 °C-ra történő lehűtés után, adjuk hozzá a következő antibiotikumokat: polimixin B szulfát (Sigma) 0,003 g, nalidixinsav (Sigma) 0,008 g, cikloheximid (Sigma) 0,2 g.

Oldjuk fel az antibiotikumokat törzsoldatokban a következők szerint: a nalidixinsavat 0,01 M NaOH-ban, a cikloheximid-et 50 %-os etil-alkoholban, a polimixin B szulfátot desztillált vízben. A törzsoldatokat szűréssel sterilizáljuk.

Megjegyzés:

Az alap táptalaj eltarthatósága 3 hónap. Az antibiotikumok hozzáadása után az eltarthatóság 1 hónap hűtőszekrényben való tárolás esetén.

—

6. függelék

Validált PCR-protokollok és reagensek

Megjegyzés:

Az előzetes vizsgálatnak lehetővé kell tennie 10^3 – 10^4 /ml *C. m. sepedonicus* sejt reprodukálható kimutatását a mintakivonatban.

Az előzetes vizsgálat nem mutathat hamis pozitív eredményeket a kiválasztott baktériumtörzsek esetében.

1. Multiplex PCR-protokoll belső PCR- kontrollal (Patrik, 2000)

1.1. Oligonukleotid primerek

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

Várható fragmentum méret a *C. m. subsp. sepedonicus* DNS templátból = 502 bp (PSA-primerkészlet)

Várható fragmentum méret a 18S rRNS belső PCR-ellenőrzésből = 377 bp (NS-primerkészlet)

1.2. PCR reakcióelegy

Reagens	Mennyiség reakciónként	Végkoncentráció
Steril UPW	15,725 µl	
10x PCR-puffer ⁽¹⁾ (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1x (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (V. frakció) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
d-nTP elegy (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
PSA-1 primer (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
PSA-R primer (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
NS-7-F primer (10 µM) ⁽²⁾	0,1 µl	0,04 µM
NS-8-R primer (10 µM) ⁽²⁾	0,1 µl	0,04 µM
Taq polimeráz (5 U/µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1,0 U
A minta térfogata	5,0 µl	
Össztérfogat:	25,0 µl	

⁽¹⁾ A módszereket Taq polimeráz felhasználásával validálták (Perkin Elmer [AmpliTaq] and Gibco BRL).

⁽²⁾ Az NS-7-F és az NS-8-R primerek koncentrációját a burgonyagumó köldökrészéből vett darab homogenizációs módszerrel végzett extrakciójára és a Patrik-féle DNS-tisztításra (2000) optimalizálták (lásd a 6.1. a) és a 6.2. szakaszt). A reagens koncentrációk újraoptimalizálására lesz szükség rázással végzett extrakció vagy eltérő DNS-izolálási módszerek használata esetén.

1.3. A PCR-reakció feltételei

Futtassuk a következő programot:

1 ciklusban:	i.	3 percig 95 °C-on (DNS templát denaturálása)
10 ciklusban:	ii.	1 percig 95 °C-on (DNS templát denaturálása)
	iii.	1 percig 64 °C-on (primerek temperálása)
	iv.	1 percig 72 °C-on (másolat meghosszabbítása)

25 ciklusban:	v.	30 másodpercig 95 °C-on (DNS templát denaturálása)
	vi.	30 másodpercig 62 °C-on (primerek temperálása)
	vii.	1 percig 72 °C-on (másolat meghosszabbítása)
1 ciklusban:	viii.	5 percig 72 °C-on (végső meghosszabbítás)
	ix.	tartsuk 4 °C-on.

Megjegyzés:

Ezt a programot MJ Research PTC 200 thermal cycler-re optimalizálták. Más modellek használata szükségessé teheti a ii., iii., iv., v., vi. és vii. cikluslépések időtartamának megváltoztatását.

1.4. *A fragmentum restrikciós enzim elemzése*

A *C. m. subsp. sepedonicus* DNS-ből felerősített PCR-termékek jellegzetes fragmentumhossz polimorfizmust mutatnak Bgl II. enzimmel 37 °C-on 30 percig végzett inkubálás után. A *C. m. subsp. sepedonicus*-specifikus fragmentumból kapott restrikciós fragmentumok mérete 282 bp és 220 bp.

2. **A betöltő puffer elkészítése**

2.1. *Brómfenol kék (10 %-os törzsoldat)*

Brómfenol kék	5 g
Desztillált víz (bidest)	50 ml

2.2. *Betöltő puffer*

Glicerín (86 %)	3,5 ml
Brómfenol kék (5.1)	300 µl
Desztillált víz (bidest)	6,2 ml

3. **10x Tris-acetát-EDTA (TAE) puffer, pH 8,0**

Tris puffer	48,4 g
Jégecet	11,42 ml
EDTA (dinátrium só)	3,72 g
Desztillált víz	1,00 liter

Hígítsuk 1x-re használat előtt.

Kereskedelmi forgalomban is kapható (pl. Invitrogen vagy azzal egyenértékű).

7. függelék

Validált reagensek a FISH-teszthez

1. Oligo-próbák

CMS-CY3-01 Cms-specifikus teszt	5'- ttg cgg ggc gca cat ctc tgc acg -3'
EUB-338-FITC nem-specifikus eubaktérium teszt	5'- gct gcc tcc cgt agg agt-3'

2. Fixáló oldat

(VIGYÁZAT! A FIXÁLÓ PARAFORMALDEHIDET TARTALMAZ, AMELY MÉRGEZŐ. HASZNÁLJON KESZTYŰT, ÉS NE LÉLEGEZZE BE. TANÁCSOS VEGYIFÜLKÉBEN DOLGOZNI.)

- Melegítsünk 9 ml molekuláris tisztaságú vizet (pl. Ultra tiszta vizet [UPW]) körülbelül 60 °C-ra, és adjunk hozzá 0,4 g paraformaldehidet. A paraformaldehid feloldódik 5 csepp 1N NaOH hozzáadása és mágneses keverőbottal végzett keverés után.
- Állítsuk be a pH-t 7,0-ra 1 ml 0,1 M foszfát-puffer (PB; pH 7,0) és 1 N HCl cseppek hozzáadásával. Ellenőrizzük a pH-t indikátorpapírral, és szükség esetén állítsuk be HCl-lel vagy NaOH-val.

(FIGYELEM! NE HASZNÁLJON PH-MÉRŐT A PARAFORMALDEHIDET TARTALMAZÓ OLDATOKBAN.)

- Szűrjük át az oldatot 0,22 µm membránszűrőn, és pormentesen 4 °C-on tároljuk a további használatig.

- Megjegyzés:

Alternatív fixáló oldat: 96 %-os etil-alkohol.

3. 3x Hibmix

NaCl	2,7 M
Tris-HCl	60 mM (pH 7,4)
EDTA (szűrővel sterilizált és autoklávozott)	15 mM

Hígítsuk 1x-re szükség szerint.

4. Hibridizációs oldat

1x Hibmix

Nátrium-dodecil-szulfát (SDS)	0,01 %
EUB 338 teszt	5 ng/µl
CMSCY301 teszt	5 ng/µl

Készítsünk nagyobb mennyiséget a hibridizációs oldatból az 1. táblázatban megadott értékek szerint. Mindegyik lemezhez (melyek 2 különböző mintát tartalmaznak, és azok másolatait) 90 µl hibridizációs oldatra van szükség.

Táblázat: A hibridizációs elegy elkészítéséhez javasolt mennyiségek

A lemezek száma:	2	8
Steril UPW	50,1	200,4
3x hibmix	30,0	120,0
1 % SDS	0,9	3,6
EUB 338 teszt (100 ng/µl)	4,5	18,0
CMSCY301 teszt (100 ng/µl)	4,5	18,0
Össztérfogat (µl)	90,0	360,0

Megjegyzés: A fényérzékeny oligo-próbák tartalmazó oldatokat tároljuk sötétben – 20 °C-on. Óvjuk a közvetlen napfénytől és a mesterséges fénytől a használat során.

5. 0,1 M Foszfát-puffer, pH 7,0

Na ₂ HPO ₄	8,52 g
KH ₂ PO ₄	5,44 g
Desztillált víz	1,00 liter

Oldjuk fel az összetevőket, ellenőrizzük a pH-t, és sterilizáljuk autoklávban 121 °C-on 15 percig.

8. függelék**A tojásgyümölcs nevelése**

Vessük el a tojásgyümölcs (*Solanum melongena*) vetőmagját pasztörizált, vetőmag elvetésénél használt komposztba. Ültessük át a teljesen szétnyílt sziklevelekkel rendelkező palántákat (10–14 nap) pasztörizált, tenyészvénybe való ültetésnél használt komposztba.

A tojásgyümölcs-növényeket üvegházban kell nevelni a következő környezeti feltételek mellett:

Nappalhossz		14 óra vagy természetes nappalhossz, ha az hosszabb;
Hőmérséklet	nappali	21–24 °C,
	éjszakai	15 °C.

Fogékony tojásgyümölcs-fajta: „Black Beauty”,
„Long Tom”,
„Rima”,
„Balsas”.

Beszállítók: lásd a honlapot <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

9. függelék

Gram-festési eljárás (Hucker-féle módosítás) (Doetsch, 1981) ⁽¹⁾*Kristályibolya-oldat*

Oldjunk fel 2 g kristályibolyát 20 ml 95 %-os etil-alkoholban.

Oldjunk fel 0,8 g ammónium-oxalátot 80 ml desztillált vízben.

Elegyítsük a két oldatot.

Lugol-féle jódd

Jód	1 g
Kálium-jodid	2 g
Desztillált víz	300 ml

Törjük össze együtt a szilárd összetevőket mozsártörővel egy mozsárban. Adjuk hozzá a vízhez, és keverjük, hogy feloldódjanak egy zárt edényben.

Szafranin ellenfestő oldat

Törzsoldat:

Szafranin O	2,5 g
95 %-os etil-alkohol	100 ml

Elegyítsük, és tároljuk.

Hígítsuk: 1:10 arányban, hogy megkapjuk a munkaoldatot.

Festési eljárás

1. Készítsünk keneteket, levegőn szárítsuk meg, és hővel rögzítsük.
2. Árasszuk el a lemezt kristályibolya oldattal egy percre.
3. Rövid ideig mossuk csapvízzel.
4. Árasszuk el Lugol-féle jóddal egy percre.
5. Mossuk le csapvízzel, és itassuk szárazra.
6. Színtelenítsük 95 %-os etil-alkohollal, cseppenként hozzáadva, amíg további szín már nem vonható ki, vagy merítsük bele enyhén rázogatva 30 másodpercre.
7. Mossuk le csapvízzel, és itassuk szárazra.
8. Árasszuk el szafranin-oldattal 10 másodpercre.
9. Mossuk le csapvízzel, és itassuk szárazra.

A Gram-pozitív baktériumok ibolyakékre festődnek; a Gram-negatív baktériumok szegfűvörösre festődnek.

⁽¹⁾ Szintén használhatók kereskedelmi forgalomban kapható oldatok és festőkészletek.

IRODALOM

1. Anonymous, 1987. Scheme of the detection and diagnosis of the ring rot bacterium *Corynebacterium sepedonicum* in batches of potato tubers. Commission of the European Communities, Luxembourg. Publ EUR 11 288 EN, 21 pp.
2. Bradbury, J. F., 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. Rev. Pl. Path., 49, 213-218.
3. Dinesen, I. G., 1984. The extraction and diagnosis of *Corynebacterium sepedonicum* from diseased potato tubers. EPPO Bull. 14 (2), 147-152.
4. Doetsch, R. N., 1981. Determinative methods of light microscopy. In: Manual of methods for general bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, 21-23.
5. Hugh, R. and Leifson, F., 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. J. Bact., 66, 24-26.
6. Janse, J. D., 1991. Infra- and intra-specific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty-acid analysis. Systematic and Applied Microbiology 14; 335-345.
7. Janse, J. D. and J. Van Vaerenbergh. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (*Corynebacterium sepedonicum*) in potato. EPPO Bull., No 17, 1987, pp. 1-10.
8. Jansing, H. and K. Rudolph, 1998. Physiological capabilities of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* and development of a semi-selective medium. Journal of Plant Diseases and Protection, 105, 590-601.
9. Kovacs, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature, Lond., 178, 703.
10. Klement Z.; Rudolph, K and D. C. Sands, 1990. Methods in Phytobacteriology. Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 pp.
11. Lelliott, R. A., 1966. The plant pathogenic coryneform bacteria. J. appl. Bact., 29, 114-118.
12. Lelliott, R. A., E. Billing and A. C. Hayward, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads J. appl. Bact., 29, 470-489.
13. Lelliott, R. A. and P. W., Sellar, 1976. The detection of latent ring rot (*Corynebacterium sepedonicum* (Spiek. et Koth.) Skapt. et Burkh.) in potato stocks. EPPO Bull., 6 (2), 101-106.
14. Li, X. and S.H. de Boer, 1995. Selection of Polymerase Chain Reaction primers from RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Phytopathology, 85, 837-842.
15. Mills, D., Russell, B., W. and J., W. Hanus, 1997. Specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* by amplification of three unique DNA sequences isolated by subtraction hybridization. Phytopathology, 87, 8, 853-861.
16. Pastrik, K. -H. and R.A. Rainey. 1999. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. J. Phytopathology 147; 687-693.
17. Pastrik, K.-H., 2000. Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. European Journal of Plant Pathology, 106, 155-165.
18. Ramamurthi, C. S., 1959. Comparative studies on some Gram-positive phytopathogenic bacteria and their relationship to the Corynebacteria. Mem. Cornell agric. Exp. Sta., 366, 52 pp.
19. Schaad, W., Berthier-Schaad, Y., Sechler, A. and Knorr, D. (1999) Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system. Plant Disease 83; 1095-1100.
20. Schaad, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Schaad [Hrsg.]. - 3. ed.; St. Paul, Minnesota; 373 pp.
21. Skerman, V. B. D., 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria. 2nd ed., William and Wilkins Company, Baltimore.
22. Smith, N. C.; Hennesy, J; Stead, D.E., 2001. Repetitive sequence-derived PCR profiling using the BOX-A1 *Ralstonia solanacearum* primer for rapid identification of plant pathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. European Journal of Plant Pathology, 107 (7), 739-748.
23. Sneath, P. H. A. and V. G. Collins, 1974. A study in test reproducibility between laboratories: report of *Pseudomonas* working party. Antonie van Leeuwenhoek, 40, 481-527.
24. Stead, D.E. 1992. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty-acid profiles. International Journal of Systematic Bacteriology 42; 281-295.
25. Wullings, B. A.; van Beuningen, A. R.; Janse, J. D. and A. D. L. Akkermans, 1998. Detection of *Ralstonia solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent *in situ* hybridization with 23s rRNA-targeted probes. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4546-4554.

II. MELLÉKLET

1. A károsító minden olyan gyanított előfordulása esetén, amikor a szűrővizsgálat(ok) során pozitív eredmény került megállapításra az I. mellékletben meghatározott módszereknek megfelelően, és a gyanú az említett módszerek befejezése révén megerősítésre vagy eloszlátásra vár, meg kell őrizni és megfelelően fent kell tartani:

- az összes gumót és – amennyiben lehetséges – az összes növényt, amelyekből mintát vettünk,
- a kivonatok maradékait és a szűrővizsgálat(ok)hoz készített további anyagokat, pl. immunfluoreszcenciás lemezeket,

és

- a teljes vonatkozó dokumentációt,

az említett módszerek befejezéséig.

A gumók megőrzése lehetőséget fog biztosítani a fajtavizsgálat elvégzésére, amennyiben helyénvaló.

2. A károsító előfordulásának pozitív megerősítése esetén, meg kell őrizni és megfelelően fent kell tartani:

- az 1. bekezdésben meghatározott anyagokat,

és

- a gumó- vagy növénykivonattal beoltott, fertőzött tojásgyümölcsből vett mintát,

és

- a károsító izolált tenyészetét,

legalább egy hónapig az 5. cikk (2) bekezdése szerinti bejelentési eljárást követően.

III. MELLÉKLET

1. A feltételezett fertőzés mértékének az 5. cikk (1) bekezdése b) pontja szerinti meghatározásánál a következőket kell figyelembe venni:
 - az 5. cikk (1) bekezdése a) pontja szerint fertőzöttnek minősülő termőhelyen termesztett gumókat vagy növényeket,
 - az 5. cikk (1) bekezdése a) pontja szerint fertőzöttnek minősülő gumókkal vagy növényekkel termelési kapcsolatban álló termőhely(ek)et, beleértve azokat, ahol – közvetlenül, vagy közös szolgáltatón keresztül – közösen használnak termelési eszközöket és létesítményeket,
 - a gumókat vagy növényeket, amelyeket az előző francia bekezdésben említett termőhelye(ke)n termesztettek, vagy amelyek jelen voltak ilyen termőhelye(ke)n abban az időszakban, amikor az 5. cikk (1) bekezdése a) pontja szerint fertőzöttnek minősülő gumók vagy növények jelen voltak az első francia bekezdésben említett telephelyeken vagy termőhelyen,
 - telephelyeket, ahol a fenti francia bekezdésekben említett termőhelyekről származó burgonyát kezelik,
 - mindazokat a gépeket, járműveket, hajókat, raktárakat, vagy azok részeit, valamint minden egyéb tárgyat, beleértve a csomagolóanyagokat is, amelyek érintkezésbe kerülhetnek az 5. cikk (1) bekezdése a) pontja szerint fertőzöttnek minősülő gumókkal vagy növényekkel,
 - mindazokat a gumókat vagy növényeket, amelyek az előző francia bekezdésben felsorolt építmények vagy tárgyak bármelyikében tárolásra kerültek, vagy azok bármelyikével érintkezésbe kerültek, ezen építmények és tárgyak tisztítását és fertőtlenítését megelőzően,
 - a 6. cikk szerint elvégzett vizsgálat eredményeként, azokat a gumókat vagy növényeket, amelyek egyenes- vagy oldalági klonális kapcsolatban állnak az 5. cikk (1) bekezdése a) pontja szerint fertőzöttnek minősülő gumókkal vagy növényekkel, és amelyeknél úgy tűnik, hogy – bár a károsító kimutatására irányuló vizsgálat hozhatott negatív eredményt – a fertőzés valószínűsíthető a klonális kapcsolat útján. Fajtavizsgálatra kerülhet sor a fertőzött és klonális kapcsolatban álló gumók vagy növények azonosságának igazolására,

és

 - az előző francia bekezdésben említett gumók vagy növények termőhelyét/termőhelyeit.
2. A fertőzés lehetséges terjedésének az 5. cikk (1) bekezdése c) pontja szerinti meghatározásánál a következőket kell figyelembe venni:
 - a burgonya vagy az egyéb gazdanövények más termőhelyeinek közelségét,
 - a vetőburgonya készletek közös termesztését és felhasználását.
3. Az 5. cikk (2) bekezdése első albekezdésében említett bejelentést a következőképpen kell megtenni:
 - közvetlenül a károsító jelenlétének az I. mellékletben meghatározott módszerekkel végzett laboratóriumi vizsgálat útján történt megerősítése után, legalább:
 - a burgonyatétel fajtaneve,
 - a típus (áru-, vető-, stb.) és – ahol alkalmazható – a vetőmag kategóriája,
 - amikor fennáll a veszélye másik tagállam(ok)ból érkező vagy oda szállított burgonya befertőződésének, a tagállam – amelyben az előfordulást megerősítették – haladéktalanul értesíti az érintett tagállamo(ka)t azon információkról, amelyek az 5. cikk (3) bekezdésének való megfeleléshez szükségesek, úgymint:
 - a burgonyatétel fajtaneve,
 - a feladó és a címzett neve és címe,
 - a burgonyatétel szállításának időpontja,

- a szállított burgonyatétel mérete,
- a növényútlevél másolata vagy legalább a növényútlevél száma, adott esetben, vagy a termelő vagy forgalmazó regisztrációs száma és a szállítási értesítés másolata.

A Bizottságot haladéktalanul értesítik ezen információ közléséről.

- az összes vizsgálat lezárása után, minden egyes esetben:
 - a fertőzés megerősítésének időpontja,
 - a fertőzés forrásának és lehetséges terjedésének azonosítása céljából végzett vizsgálat rövid leírása, ideértve a mintavételezés szintjét,
 - a fertőzés azonosított vagy vélelmezett forrására/forrásaira vonatkozó információ,
 - a minősített fertőzés mértékére vonatkozó részletek, beleértve a termőhelyek számát és burgonya esetében, a tételek számát a fajta és – vetőburgonyánál – a kategória megjelölésével,
 - a kijelölt övezetre vonatkozó részletek, beleértve a fertőzöttnek nem minősített, de az övezetbe bevont termőhelyek számát,
 - egyéb információk a megerősített gócszerű előfordulásokra vonatkozóan a Bizottság esetleges igénye szerint.
-

IV. MELLÉKLET

1. A 7. cikk (1) bekezdésében említett hatóságilag felügyelt intézkedések a következők:

- állati takarmányként való felhasználás olyan hőkezelés után, hogy ne állhasson fenn a károsító túlélésének a veszélye,
- vagy
- a biztonságos elhelyezés egy olyan hatóságilag engedélyezett biztonságos hulladéklerakó telepen, ahol nem áll fenn a kórokozó környezetbe jutásának az azonosítható veszélye, pl. a mezőgazdasági területekre való átszivárgással,
- vagy
- elégetés,
- vagy
- ipari feldolgozás azonnali elszállítással közvetlenül egy olyan feldolgozóüzembe, amely rendelkezik hatóságilag engedélyezett hulladék-ártalmatlanító berendezésekkel, melyek tekintetében megállapítást nyert, hogy nem áll fenn a károsító terjedésének azonosítható veszélye, és rendelkezik egy programmal legalább a szállítójárművek tisztítására és fertőtlenítésére,
- vagy
- egyéb intézkedések, feltéve, hogy megállapítást nyert, hogy nem áll fenn a károsító terjedésének azonosítható veszélye; ezekről az intézkedésekről és az indoklásukról értesíteni kell a Bizottságot és a többi tagállamot.

Bármilyen, a fentiekkel összefüggő vagy azoktól származó hulladékot ezen irányelv V. mellékletének megfelelően hatóságilag jóváhagyott módszerrel kell elhelyezni.

2. Az 5. cikk (1) bekezdése b) pontja szerint valószínűleg fertőzöttnek nyilvánított gumóknak vagy növényeknek a 7. cikk (2) bekezdésében említett megfelelő felhasználása vagy biztonságos elhelyezése – az érintett tagállamok illetékes hivatalos szerveinek felügyelete mellett, az illetékes hivatalos szervek közötti megfelelő információcserével e felügyelet mindenkor biztosítása érdekében, és azon tagállam illetékes hivatalos szervének jóváhagyásával az első és a második francia bekezdésben említett hulladékelhelyezésre szolgáló berendezések vonatkozásában, ahol a burgonyát csomagolják vagy feldolgozzák – a következőképpen történik:

- fogyasztásra szánt áruburgonyaként való felhasználás, közvetlen szállításhoz és átcsomagolás nélküli felhasználáshoz csomagolva, egy megfelelő hulladékelhelyezésre szolgáló berendezésekkel rendelkező telepen. A vetőburgonyát csak ugyanazon a telepen lehet kezelni, ha arra elkülönítve vagy tisztítás és fertőtlenítés után kerül sor,
- vagy
- ipari feldolgozásra szánt áruburgonyaként való felhasználás, és azonnali elszállításra szánva közvetlenül egy olyan feldolgozóüzembe, amely rendelkezik megfelelő hulladékelhelyezésre szolgáló berendezésekkel és egy programmal legalább a szállítójárművek tisztítására és fertőtlenítésére,
- vagy
- néhány egyéb felhasználási vagy elhelyezési mód, feltéve, hogy nem áll fenn a károsító terjedésének azonosítható veszélye, és az említett illetékes hivatalos szervek jóváhagyásától függően.

3. A 7. cikk (3) bekezdésében említett eszközök fertőzéstől való mentesítésének megfelelő módszere a tisztítás és – amennyiben helyénvaló – a fertőtlenítés, oly módon, hogy ne álljon fenn a károsító terjedésének azonosítható veszélye, és a tagállamok illetékes hivatalos szerveinek felügyelete mellett végezve.

4. Az 5. cikk (1) bekezdése c) pontja szerint létrehozott és a 7. cikk (4) bekezdésében említett kijelölt övezetben a tagállamok által végrehajtandó intézkedéssorozat magában foglalja:

4.1. az 5. cikk (1) bekezdése a) pontja szerint fertőzöttnek minősített termőhelyek esetében:

- a) az 5. cikk (1) bekezdése a) pontja szerint fertőzöttnek minősített tábláján, vagy
- i. – a fertőzötté minősítés évét követő legalább három tenyészidőszak során,
 - intézkedéseket hoznak az árvakelésű burgonyanövények, valamint a károsító egyéb, a természetben megtalálható gazdanövényeinek eltávolítása céljából,
 - és
 - nem ültetnek burgonyagumókat, -növényeket vagy valódi magokat, vagy a károsító egyéb, természetben megtalálható gazdanövényét, vagy olyan kultúrnövényeket, amelyek esetében azonosítható kockázata van a károsító terjedésének,
 - az előző francia bekezdésben meghatározott időszakot követő első burgonyatermesztési évben, és azzal a feltétellel, hogy a táblát mentesnek találták az árvakelésű burgonyanövényektől, valamint a károsító egyéb, természetben megtalálható gazdanövényeitől a hatósági ellenőrzések során az ültetést megelőző legalább két egymást követő tenyészidőszakban, csak az áruburgonya-termesztés engedélyezhető, és a betakarított burgonyagumókat megvizsgálják az I. mellékletben részletezett eljárásnak megfelelően,
 - az előző francia bekezdésben említett időszakot követő burgonyatermesztési évben és a megfelelő vetésforgót követően, amely vetőburgonya-termesztési cél esetén legalább két év, burgonya ültethető mind vető-, mind áruburgonya-termesztési céllal, és el kell végezni a 2. cikk (1) bekezdésében részletezett hatósági felmérést, vagy
 - ii. – a fertőzötté minősítés évét követő négy tenyészidőszakon át,
 - intézkedéseket hoznak az árvakelésű burgonyanövények, valamint a károsító egyéb, természetben megtalálható gazdanövényeinek eltávolítása céljából,
 - és
 - a táblát fekete ugaroltatják, vagy állandó legelőként hasznosítják, melyet gyakran és alacsonyan kaszálnak, vagy intenzíven legeltetnek,
 - az előző francia bekezdésben meghatározott időszakot követő első burgonyatermesztési évben, és azzal a feltétellel, hogy a táblát mentesnek találták az árvakelésű burgonyanövényektől, valamint a károsító egyéb, természetben megtalálható gazdanövényeitől a hatósági ellenőrzések során az ültetést megelőző legalább két egymást követő tenyészidőszakban, a vető- vagy az áruburgonya-termesztés engedélyezhető, és a betakarított burgonyagumókat megvizsgálják az I. mellékletben részletezett eljárásnak megfelelően;
- b) a fertőzött termőhely egyéb tábláin és azzal a feltétellel, hogy az illetékes hivatalos szervek megbizonyosodtak az árvakelésű burgonyanövények és a károsító egyéb, természetben megtalálható gazdanövényei által jelentett veszély megszűnéséről:
- a fertőzötté minősítés évét követő tenyészidőszakban vagy nem ültetnek burgonyagumókat, burgonyanövényeket vagy valódi burgonyamagokat, vagy a károsító egyéb, természetben megtalálható gazdanövényeit, vagy
 - ültethetnek tanúsított vetőburgonyát kizárólag áruburgonya-termesztés céljára,
 - a fertőzötté minősítés évét követő második tenyészidőszakban vető- vagy áruburgonya-termesztés céljára kizárólag hatóságilag tanúsított vetőburgonyát vagy olyan vetőburgonyát ültetnek, amelyet bevizsgáltak a gyűrűs rothadás hiányára nézve, és hatósági felügyelet mellett termesztették a 4.1. pontban említettektől eltérő termőhelyeken,
 - legalább a fertőzötté nyilvánítás évét követő harmadik tenyészidőszakban, vető- vagy áruburgonya-termesztés céljára kizárólag tanúsított vetőburgonyát vagy olyan vetőburgonyát ültetnek, amelyet hatósági felügyelet mellett termesztettek tanúsított vetőburgonyából,

- a korábbi francia bekezdésekben említett tenyésztőidőszakok mindegyikében, intézkedéseket kell hozni az árvakelésű burgonyanövények és a károsító egyéb, természetben megtalálható gazdanövényei által jelentett veszély megszüntetéséről, valamint, hogy mindegyik burgonyatáblán hatóságilag megvizsgálják a betakarított gumókat az I. mellékletben meghatározott eljárás szerint;
 - c) közvetlenül az 5. cikk (1) bekezdése a) pontja szerinti fertőzötté minősítés és az azt követő első tenyésztőidőszak után a termőhelyen található és a burgonyatermesztéshez használt valamennyi gépet és tároló létesítményt megtisztítják, és – amennyiben szükséges – fertőtlenítik a megfelelő módszerek felhasználásával, a 3. pontban meghatározottak szerint;
 - d) a védett kultúra olyan egységében, ahol lehetőség van a termesztőközeg teljes cseréjére,
 - nem ültetnek burgonyagumókat, burgonyanövényeket vagy valódi magokat, csak akkor, ha a termesztési egységet hatóságilag felügyelt intézkedéseknek vetették alá a károsító elpusztítása és valamennyi gazdanövényanyag eltávolítása céljából, beleértve – legalább – a termesztőközeg teljes cseréjét, valamint a termesztési egység és az összes felszerelés tisztítását és fertőtlenítését, és ezt követően az illetékes hivatalos szervek engedélyt adtak a burgonyatermesztésre,
- és
- a burgonyatermesztést tanúsított vetőburgonyával, vagy bevizsgált forrásból származó minigumókkal vagy mikronövényekkel végzik;

4.2. a kijelölt övezeten belül, a 4.1. pontban részletezett intézkedések sérelme nélkül, a tagállamoknak:

- a) a fertőzötté nyilvánítást követően azonnal gondoskodniuk kell az ilyen telephelyen lévő, és a burgonyatermesztéshez használt valamennyi gép és tárolóhely megtisztításáról és fertőtlenítéséről – ahogy helyénvaló – a megfelelő módszerek felhasználásával a 3. pontban meghatározottak szerint;
- b) azonnal, és a fertőzötté minősítést követő legalább három tenyésztőidőszakon át:
 - illetékes hivatalos szerveik által biztosítják a burgonyagumókat termesztő, tároló vagy kezelő telephelyek felügyeletét, azon telephelyek felügyeletével együtt, amelyek burgonyatermesztéshez használt gépeket üzemeltetnek szerződéses alapon,
 - megkövetelik, hogy az adott övezeten belül bármiféle burgonyatermesztés céljára kizárólag tanúsított vetőburgonyát vagy hatósági felügyelet mellett termesztett vetőburgonyát használjanak, és hogy betakarítás után az 5. cikk (1) bekezdése b) pontja szerint feltehetően fertőzöttnek minősített termőhelyen termesztett vetőburgonyát laboratóriumi vizsgálatnak vessék alá,
 - megkövetelik a betakarított vetőburgonya-készleteknek az áruburgonya-készletektől elkülönített kezelését az övezeten belüli összes telephelyen, vagy a tisztításra és fertőtlenítésre szolgáló program lebonyolítását a vetőburgonya és az áruburgonya készletek kezelése között,
 - hivatalos felmérést végeznek a 2. cikk (1) bekezdésében részletezettek szerint;
- c) kialakítanak egy programot – amennyiben helyénvaló – a teljes vetőburgonya készletnek megfelelő időtartam alatt történő lecserélésére.

V. MELLÉKLET

A IV. melléklet (1) bekezdésében említett hatóságilag jóváhagyott hulladék elhelyezési módszereknek eleget kell tenniük az alábbi rendelkezéseknek, hogy megelőzzék a károsító elterjedésének bármilyen azonosítható veszélyét:

- i. burgonyahulladék (beleértve a kiselejtezett burgonyát és héjat), valamint bármilyen más, a burgonyához kapcsolódó szilárd hulladékot (beleértve földet, köveket és egyéb törmelékot) vagy
 - olyan hatóságilag engedélyezett, erre a célra rendelt hulladéklerakó telepen kell elhelyezni, ahol nem áll fenn a kórokozó környezetbe jutásának azonosítható veszélye, pl. a mezőgazdasági területekre való átszivárgással. A hulladékot biztonságos körülmények között közvetlenül a lerakóhelyre kell szállítani oly módon, hogy ne álljon fenn a hulladék elvesztésének veszélye,vagy
 - elégetés,vagy
 - egyéb intézkedések, feltéve, hogy megállapítást nyert, hogy nem áll fenn a károsító terjedésének azonosítható veszélye; ezekről az intézkedésekről és az indokolásukról értesíteni kell a Bizottságot és a többi tagállamot;
- ii. technológiai szennyvíz: az elhelyezést megelőzően a lebegő szilárd anyagokat tartalmazó szennyvizet szűrési vagy ülepítési eljárásnak kell alávetni e szilárd anyagok eltávolítása érdekében. Ezeket a szilárd anyagokat az i. albekezdésben foglaltak szerint kell elhelyezni.

A folyadékot ezt követően vagy

- úgy kell hőkezelné az elhelyezést megelőzően, hogy a szennyvíz minden részében a hőmérséklet 30 percen keresztül legalább 60 °C legyen,
- vagy
- egyéb olyan hatóságilag engedélyezett és hatóságilag felügyelt módon kell elhelyezni, amelyenél nem áll fel a hulladék mezőgazdasági területtel való érintkezésének azonosítható veszélye. Ennek módzatairól értesíteni kell a többi tagállamot és a Bizottságot.

Az e mellékletben foglalt rendelkezéseket kell alkalmazni a fertőzött tételek kezelésére, elhelyezésére és feldolgozására vonatkozóan is.