

**НАРЕДБА № 11 ОТ 10 АПРИЛ 2001 Г. ЗА БОРБА С
БАКТЕРИАЛНОТО КАФЯВО ГНИЕНЕ ПО КАРТОФИТЕ,
ПРИЧИНЯВАНО ОТ БАКТЕРИЯТА RALSTONIA
SOLANACEARUM (SMITH) YABUUCHI ET AL. (ЗАГЛ. ИЗМ. -
ДВ, БР. 71 ОТ 2006 Г.)**

*Издадена от Министерството на земеделието, горите и
аграрната реформа*

*Обн. ДВ. бр.40 от 20 Април 2001г., изм. ДВ. бр.8 от 22 Януари
2002г., изм. ДВ. бр.71 от 1 Септември 2006г., изм. ДВ. бр.28 от 3
Април 2007г.*

**Глава първа.
ОБЩА РАЗПОРЕДБА**

Чл. 1. (1) (Изм. - ДВ, бр. 71 от 2006 г.) С тази наредба се уреждат задължителните мерки за борба с бактериалното кафяво гниене по картофите с причинител бактерията *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., наричана по-нататък "вредител", по растенията гостоприемници, посочени в приложение № 1, наричани по-нататък "растения".

(2) Мерките за борба с вредителя включват:

1. предотвратяване на неговата поява;
2. при откриване определяне района на разпространение;
3. предотвратяване на по-нататъшното му разпространение;
4. неговото пълно унищожаване.

**Глава втора.
МЕРКИ ЗА ОТКРИВАНЕ НА ВРЕДИТЕЛЯ**

Чл. 2. (1) (Изм. - ДВ, бр. 8 от 2002 г., доп. - ДВ, бр. 71 от 2006 г.) Националната служба за растителна защита (НСРЗ) извършва оценка на риска от разпространение на вредителя, организира и провежда ежегодно системни проверки и официални изследвания за откриването му по:

1. (изм. - ДВ, бр. 71 от 2006 г.) растенията, произведени на територията на страната;
2. другите потенциални източници на зараза, свързани с производството на растения - други растения, включително диворастящи растения гостоприемници от семейство Solanaceae, повърхностни води, използвани за поливане или пръскане на растенията;
3. отпадъчните води, почвата и твърдите отпадъци от промишлени предприятия.

(2) Обхватът на проверките по ал. 1 се определя според установената степен

риск за разпространение на вредителя.

Чл. 3. (1) (Изм. - ДВ, бр. 8 от 2002 г., изм. - ДВ, бр. 28 от 2007 г., в сила от 01.04.2007 г.) Проверките, броят и начините за вземане на проби и извършването на изследвания се провеждат съгласно процедурите, описани в приложение № 2.

(2) (Доп. - ДВ, бр. 71 от 2006 г., изм. - ДВ, бр. 28 от 2007 г., в сила от 01.04.2007 г.) Изследванията по чл. 2, ал. 1 се извършват съгласно приложение № 2 при спазване на условията, заложи в приложение II, т. 1 и изискванията по приложение II, т. 2.

(3) (Изм. - ДВ, бр. 8 от 2002 г.) Взетите проби се анализират в лабораториите на НСРЗ, а окончателното заключение за резултатите от изследванията се прави от Централна лаборатория по карантинна на растенията (ЦЛКР) в НСРЗ.

(4) (Нова - ДВ, бр. 71 от 2006 г.) При необходимост и на база на нови научни данни и биологични характеристики на вредителя генералният директор на НСРЗ може да разшири броя и обектите на изследванията върху другите растения гостоприемници на вредителя и специални системи за производство на растителни материали.

(5) (Нова - ДВ, бр. 71 от 2006 г., в сила от 01.01.2006 г.) Националната служба за растителна защита ежегодно до 1 юни уведомява другите държави членки от Европейската общност и Европейската комисия за подробностите и резултатите от официалните изследвания, описани в Приложение I, раздел II, т. 2 за производството от последната година, с изключение на картофи, използвани като семе за собствена продукция, за които нотификацията трябва да бъде изпращана до 1 септември.

Глава трета.

МЕРКИ ЗА БОРБА СРЕЩУ ВРЕДИТЕЛЯ И НЕГОВОТО РАЗПРОСТРАНЕНИЕ

Чл. 4. (1) (Предишен текст на чл. 4, доп. - ДВ, бр. 71 от 2006 г., изм. - ДВ, бр. 28 от 2007 г., в сила от 01.04.2007 г.) Когато бъдат установени диагностични симптоми за наличие на заболяването, причинено от вредителя, и наличие на положителна реакция при тестови изпитания за бързо откриване, проведени съгласно чл. 3 и приложение № 3, фитосанитарните инспектори уведомяват НСРЗ:

1. забраняват движението на растения, произхождащи от всички парцели, партии или пратки, от които са взети пробите, освен под техен контрол и при условие, че няма риск от разпространение на вредителя;

2. предприемат необходимите мерки за достигане до източника на предполагаемото заразяване;

3. вземат подходящи превантивни мерки за предотвратяване разпространението на вредителя.

(2) (Нова - ДВ, бр. 71 от 2006 г., в сила от 01.01.2006 г.) В случай на предполагаема поява и при наличие на риск от заразяване на растителни материали или повърхностни води на друга/други държава(и) членка(и) от Европейската общност НСРЗ незабавно уведомява засегнатата/засегнатите държава(и) членка(и).

(3) (Нова - ДВ, бр. 71 от 2006 г., в сила от 01.01.2006 г.) В случай че НСРЗ получи информация от друга държава членка по смисъла на ал. 2, предприема необходимите предпазни мерки.

Чл. 5. (1) (Предишен текст на чл. 5, изм. - ДВ, бр. 71 от 2006 г.) Когато проведените по реда на чл. 3 изследвания потвърдят наличието на вредителя във взетите проби, фитосанитарните инспектори вземат следните мерки:

1. по отношение на картофите и доматиите:

а) (изм. - ДВ, бр. 71 от 2006 г., изм. - ДВ, бр. 28 от 2007 г., в сила от 01.04.2007 г.) извършват проверка за определяне на първичните източници на зараза съгласно изискванията на приложение № 4 и извършват допълнителни изследвания на всички налични картофи за семе, клоново свързани със заразените;

б) обявяват за заразени пратката или партидата, от които е взета пробата, земеделската техника, машините, превозните средства, съдовете, складовите помещения или части от тях и всички други предмети, включително опаковките, които са били в контакт с растенията, от които е взета пробата;

в) обявяват за заразени парцелите, производствените единици и местата на производство, откъдето е взета пробата, ако пробите са взети по време на вегетационния период, и уведомяват ИАСАС;

г) (изм. - ДВ, бр. 28 от 2007 г., в сила от 01.04.2007 г.) определят според изискванията на приложение № 5 вероятния размер на заразата, като изхождат от контакта на заразения материал с други растения при производство, напояване или размножаване;

д) (изм. - ДВ, бр. 71 от 2006 г., изм. - ДВ, бр. 28 от 2007 г., в сила от 01.04.2007 г.) определят според изискванията на приложение № 5 зона на обявената зараза, на вероятната зараза и на възможното разпространение на вредителя;

2. по отношение на другите растения гостоприемници:

а) извършват проверка съгласно т. 1, буква "а";

б) обявяват за заразени растенията гостоприемници на вредителя, от които е взета пробата;

в) (изм. - ДВ, бр. 71 от 2006 г.) определят вероятния размер и зоната на заразата;

3. по отношение на повърхностни води (включително течните отпадъци от предприятия за промишлена преработка или разфасовка на растения) и на диворастящите растения гостоприемници от семейство Solanaceae, изложени на риск от заразяване:

а) извършват изследвания на проби от повърхностни води и диворастящи растения с цел определяне размера на заразяването;

б) обявяват за заразени повърхностни води, когато резултатите от изследванията са положителни;

в) (изм. - ДВ, бр. 71 от 2006 г.) определят вероятния размер и зоната на заразата.

(2) (Нова - ДВ, бр. 71 от 2006 г., в сила от 01.01.2006 г.) При всяка доказана зараза НСРЗ уведомява другите държави членки от Европейската общност и Европейската комисия и предоставя данните по ал. 1 съгласно изискванията на приложение IV, т. 3, като допълнително се предоставя и информацията, описана в т. 4 на приложение IV.

(3) (Нова - ДВ, бр. 71 от 2006 г., в сила от 01.01.2006 г.) В случай че НСРЗ получи информация в съответствие с ал. 2 от друга държава членка на Европейската общност, предприема всички мерки, описани в ал. 1.

Чл. 6. (1) (Доп. - ДВ, бр. 71 от 2006 г., изм. и доп. - ДВ, бр. 28 от 2007 г., в сила

от 01.04.2007 г.) Забранено е засаждането на растения, обявени за заразени по смисъла на чл. 5, ал. 1, т. 1, букви "б" и "в". По отношение на тях се прилага една от мерките по приложение № 6 и приложение № 7 с цел премахване на риска от разпространение на заразата.

(2) (Изм. - ДВ, бр. 71 от 2006 г.) Забранено е засаждането на растения, определени като вероятно заразени по смисъла на чл. 5, ал. 1, т. 1, букви "г" и "д". Те се използват или унищожават по подходящ начин под контрола на фитосанитарен инспектор.

(3) (Изм. - ДВ, бр. 71 от 2006 г., изм. - ДВ, бр. 28 от 2007 г., в сила от 01.04.2007 г.) Земеделската техника, машините за манипулации, транспортните средства, съдовете, складовите помещения или части от тях и всички други предмети, включително опаковките които са имали контакт с изброените в ал. 1 и 2 растения, се унищожават или обеззаразяват по посочените в приложение № 6 методи. След обеззаразяването те се считат за безопасни.

(4) (Доп. - ДВ, бр. 71 от 2006 г., в сила от 01.01.2006 г., изм. - ДВ, бр. 28 от 2007 г., в сила от 01.04.2007 г.) Независимо от мерките, предприети съгласно ал. 1 - 3, фитосанитарните инспектори могат да прилагат и други необходими мерки, предвидени в приложение № 6. За подробностите по тези мерки ежегодно се уведомяват държавите членки от Европейската общност и Европейската комисия.

Чл. 7. Забранени са съхранението и извършването на манипулации с вредителя.

Чл. 8. (Изм. - ДВ, бр. 8 от 2002 г., доп. - ДВ, бр. 71 от 2006 г.) Изключения от забраните по чл. 6, ал. 1 и 2 и чл. 8 за извършване на научни изследвания и селекция се разрешават по реда на Наредба № 1 от 2002 г. за условията, при които вредители, растения, растителни и други продукти се използват за научноизследователски цели и селекция въвеждаща Директива на Съвета 95/44/ЕС от 26 юли 1995 г., определяща условията, при които някои вредители, растения, растителни и други продукти, изброени в Приложения I и V към Директива на Съвета 2000/29/ЕС, могат да се въвеждат или движат в общността или някои защитени зони от нея, за опитни или научни цели и за работа по сортова селекция в националното законодателство.

Чл. 9. (1) (Доп. - ДВ, бр. 71 от 2006 г., изм. - ДВ, бр. 28 от 2007 г., в сила от 01.04.2007 г.) За посев се използват картофи, които отговарят на изискванията на Наредба № 1 за фитосанитарен контрол въвеждаща Директива на Съвета 2000/29/ЕС от 8 май 2000 г. за защитни мерки срещу въвеждането в общността на вредители по растенията или растителни продукти и срещу тяхното разпространение в общността, и произлизат по права линия от сертифициран посевен материал, в който не са открити следи от вредителя след изследвания, проведени съгласно процедурите, описани по приложение № 2 в ЦЛКР.

(2) (Изм. - ДВ, бр. 71 от 2006 г.) При установяване на вредителя в картофи за семепроизводство с произход от страната изследвания се провеждат на:

1. предходни поколения, в това число началната клонова селекция и базовите картофи за семепроизводство, или

2. в случай на липса на клонова връзка, чрез изследвания, обхващащи всички

базови клонове на картофи за семепроизводство или обхващащи предишни размножавания, в това число начална клонова селекция, и

3. в другите случаи или по всяко растение на началната клонова селекция или по представителните проби на базовите картофи за семепроизводство или на предишните размножавания.

Чл. 10. (1) (Изм. - ДВ, бр. 8 от 2002 г., предишен текст на чл. 10 - ДВ, бр. 71 от 2006 г.) Генералният директор на Националната служба за растителна защита със заповеди разпорежда прилагането на допълнителни, както и на по-строги мерки за борба срещу вредителя или за предотвратяване на неговото разпространение, които не противоречат на изискванията на Наредба № 1 за фитосанитарен контрол.

(2) (Нова - ДВ, бр. 71 от 2006 г., в сила от 01.01.2006 г.) За подробностите по мерките в ал. 1 НСРЗ официално уведомява държавите - членки на Европейската общност, и Европейската комисия.

Допълнителни разпоредби

§ 1. (Нов - ДВ, бр. 71 от 2006 г.) По смисъла на наредбата "стокова продукция от картофи" е продукцията, съставена от картофи за преработка и консумация, които не са предназначени за засаждане.

§ 2. (Нов - ДВ, бр. 71 от 2006 г.) С тази наредба се въвежда Директива на Съвета 98/57/ЕС от 20 юли 1998 г. за контрол на *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.

§ 2а. (Нов - ДВ, бр. 28 от 2007 г., в сила от 01.04.2007 г.) С тази наредба се въвеждат разпоредбите на Директива на Комисията 2006/63/ЕС, изменяща приложенията на Директива на Съвета 98/57/ЕС за контрол на *Ralstonia solanacearum* (smith) yabuuchi et al.

Заклучителни разпоредби

§ 3. (Предишен § 1 - ДВ, бр. 71 от 2006 г.) Тази наредба се издава на основание § 3 от Закона за защита на растенията.

§ 4. (Изм. - ДВ, бр. 8 от 2002 г., предишен § 2 - ДВ, бр. 71 от 2006 г.) Изпълнението на наредбата се възлага на генералния директор на Националната служба за растителна защита.

Заклучителни разпоредби

**КЪМ НАРЕДБА № 1 ОТ 4 ЯНУАРИ 2002 Г. ЗА УСЛОВИЯТА,
ПРИ КОИТО ВРЕДИТЕЛИ, РАСТЕНИЯ, РАСТИТЕЛНИ И ДРУГИ**

ПРОДУКТИ СЕ ИЗПОЛЗВАТ ЗА НАУЧНОИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ЦЕЛИ И СЕЛЕКЦИЯ

(ОБН. - ДВ, БР. 8 ОТ 2002 Г.)

§ 4. В Наредба № 11 от 2001 г. за борба с бактериалното кафяво гниене по картофите, причинявано от бактерията *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. се правят следните изменения и допълнения:

.....
2. Навсякъде в наредбата думите "Националната служба за растителна защита, карантина и агрохимия (НСРЗКА)" се заменят с "Националната служба за растителна защита (НСРЗ)".

Допълнителни разпоредби КЪМ НАРЕДБА ЗА ИЗМЕНЕНИЕ И ДОПЪЛНЕНИЕ НА НАРЕДБА № 11 ОТ 2001 Г. ЗА БОРБА С БАКТЕРИАЛНОТО КАФЯВО ГНИЕНЕ ПО КАРТОФИТЕ, ПРИЧИНЯВАНО ОТ БАКТЕРИЯТА *RALSTONIA SOLANACEARUM* (SMITH) *YABUUCHI ET AL*

(ОБН. - ДВ, БР. 71 ОТ 2006 Г.)

§ 15. В наименоването и навсякъде в наредбата думите "*Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al." се заменят с "*Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al".

Заклучителни разпоредби КЪМ НАРЕДБА ЗА ИЗМЕНЕНИЕ И ДОПЪЛНЕНИЕ НА НАРЕДБА № 11 ОТ 2001 Г. ЗА БОРБА С БАКТЕРИАЛНОТО КАФЯВО ГНИЕНЕ ПО КАРТОФИТЕ, ПРИЧИНЯВАНО ОТ БАКТЕРИЯТА *RALSTONIA SOLANACEARUM* (SMITH) *YABUUCHI ET AL*

(ОБН. - ДВ, БР. 71 ОТ 2006 Г.)

§ 16. Разпоредбите на § 2, т. 2 относно чл. 3, ал. 5, § 3, т. 2, § 4, т. 2, § 5, т. 4 и § 8, т. 2 влизат в сила от 1 януари 2007 г.

Заклучителни разпоредби КЪМ НАРЕДБА ЗА ИЗМЕНЕНИЕ И ДОПЪЛНЕНИЕ НА НАРЕДБА № 11 ОТ 2001 Г. ЗА БОРБА С БАКТЕРИАЛНОТО

КАФЯВО ГНИЕНЕ ПО КАРТОФИТЕ, ПРИЧИНЯВАНО ОТ БАКТЕРИЯТА RALSTONIA SOLANACEARUM (SMITH) YABUUCHI ET AL.

(ОБН. - ДВ, БР. 28 ОТ 2007 Г., В СИЛА ОТ 01.04.2007 Г.)

§ 11. Навсякъде в текста на наредбата приложения № 2, 3, 4 и 5 се преномерират съответно на № 3, 4, 5 и 6.

.....

§ 13. Наредбата влиза в сила от 1 април 2007 г.

Приложение № 1 към чл. 1, ал. 1

(Изм. - ДВ, бр. 71 от 2006 г., изм. - ДВ, бр. 28 от 2007 г., в сила от 01.04.2007 г.)

Раздел I

Списък на растенията гостоприемници на *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. по чл. 1:

Растения (в това число клубени) с изключение на семената от вида *Solanum tuberosum* L. - картофи.

(изм. - ДВ, бр. 71 от 2006 г.) Растения (в това число клубени) с изключение на същинските семена от вида *Solanum tuberosum* L. - картофи.

Раздел II

Изследвания

1. (доп. - ДВ, бр. 71 от 2006 г.) Официалните проверки, посочени в чл. 2, ал. 1, се основават върху биологията на вредителя и специфичните системи на производство и се извършват от фитосанитарните инспектори и включват:

а. (изм. - ДВ, бр. 71 от 2006 г., изм. - ДВ, бр. 28 от 2007 г., в сила от 01.04.2007 г.) при картофи:

- в подходящи моменти визуална инспекция през вегетацията и/или вземане на проби от картофи за производство или от други картофи, по време на вегетацията или от складовете се извършва визуален преглед, чрез разрязване на клубените, и;

- картофите за семепроизводство, а при необходимост и картофите за преработка или консумация се подлагат на официални лабораторни тестове или официално контролирани тестове съгласно процедурите, описани в приложение № 2;

б. (доп. - ДВ, бр. 71 от 2006 г.) при домати:

- визуална инспекция през подходящи интервали от време, най-малко на разсадите, предназначени за професионална употреба.

2. Официално регистрираните резултати от проверките включват:

- а. (изм. - ДВ, бр. 71 от 2006 г.) при картофите:
- предполагаема обща площ, картофи за семепроизводство и картофи за преработка или консумация;
 - класифициране по категории на картофите за семе и на картофите за консумация, а в случай на нужда и по региони;
 - броя и времето на вземането на проби за тестване;
 - броя на визуалните инспекции на терена;
 - броя (и размера на пробите) от визуалните инспекции по клубените на склад;
- б. при разсади с домати, предназначени за професионална употреба:
- оценка на общия брой растения;
 - брой на визуалните инспекции;
- в. при растения гостоприемници, различни от картофите и домати, в това число диви гостоприемници от семейство Картофови:
- ботанически вид;
 - брой на взетите проби и датата на вземането;
 - района, откъдето е взета пробата, според случая;
 - метод на анализ;
- г. (изм. - ДВ, бр. 71 от 2006 г.) при изследвания върху води и върху твърди отпадъци и течности от индустриални инсталации за обработка или пакетиране:
- броя на пробите и датата на вземането им;
 - зоната (реката) или мястото на инсталациите, където е извършено вземането на проби, според случая;
 - метода на анализ.

Приложение № 2 към чл. 3, ал. 1

(Ново - ДВ, бр. 28 от 2007 г., в сила от 01.04.2007 г.)

Схема за изпитване за диагностициране, установяване и идентифициране на *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.

Обхват на схемата за изпитване

Представената схема описва различните процедури, включени във:

- а) Диагностициране на бактериално кафяво гниене по картофените клубени и бактериално увяхване при картофи, домати и други растения гостоприемници;
- б) Установяване на *Ralstonia solanacearum* в проби, взети от картофени клубени, картофени растения, домати растения и други растения гостоприемници, вода и почва;
- в) Идентифициране на *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*).

Общи принципи

В Допълненията са дадени оптимизирани протоколи за различните методи, валидирани реагенти и подробна информация за подготвяне на материалите за изпитване и контрол. Списъкът на лабораториите, които са участвали в оптимизирането

и валидирането на протоколите, е даден в Допълнение 1.

Тъй като протоколите включват установяване на карантинен вредител и ще включват използването на живи култури на *R. solanacearum* като контролен материал, се налага процедурите да се извършват при подходящи карантинни условия с адекватни съоръжения за унищожаване на отпадъците и при условията на съответстващи разрешителни, издадени от официалните власти за растителна карантина.

Параметрите на изпитванията трябва да осигуряват последователно и възпроизводимо установяване на степени на *R. solanacearum* при определените прагове на избраните методи.

Прецизната подготовка на положителни контроли е задължителна.

Изпитването в съответствие със задължителните прагове включва също правилни настройки, поддържане и калибриране на оборудването, внимателно боравене и съхраняване на реагентите и осигуряване на всички мерки за предотвратяване на заразяване между пробите, например отделяне на положителните контроли от пробите за изпитване. За избягване на административни и други грешки, особено по отношение на етикетирването и документацията, трябва да се прилагат стандартите за управление на качеството.

Съмнението за наличие, посочено в член 4, параграф 2 от Директива 98/57/ЕО, включва положителен резултат при диагностични или скринингови тестове, извършени върху проба, определени в технологичните диаграми по-долу. Положителен първи скринингов тест (IF тест, PCR/FISH, селективна изолация) трябва да се потвърди от втори скринингов тест на базата на различен биологичен принцип.

Ако първият скринингов тест е положителен, се поражда съмнение за заразяване с *R. solanacearum* и трябва да се направи втори скринингов тест. Ако вторият скринингов тест е положителен, съмнението се потвърждава (съмнение за наличие) и изпитването по схемата трябва да се продължи. Ако вторият скринингов тест е отрицателен, се счита, че пробата не е заражена с *R. solanacearum*.

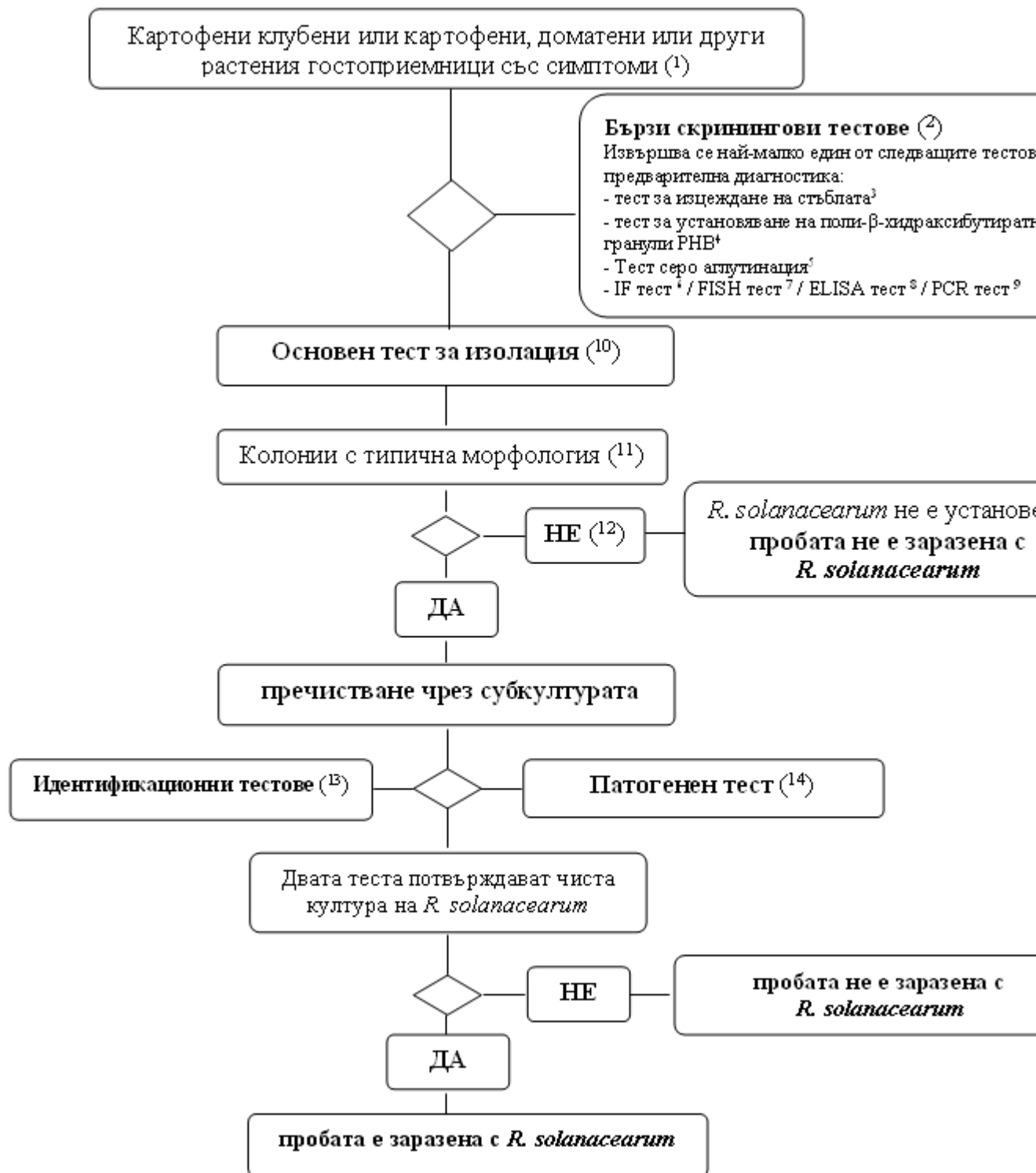
Потвърдено наличие, посочено в член 5, параграф 1 от Директива 98/57/ЕО, включва изолирането и идентифицирането на чиста култура на *R. solanacearum* с потвърждение за патогенност.

Раздел I

Прилагане на схемата за изпитване

1. Схема за диагностициране за наличие на бактериално кафяво гниене по картофените клубени и бактериално увяхване (*Ralstonia solanacearum*) при картофени, домати и други растения гостоприемници със симптоми на бактериално кафяво гниене или бактериално увяхване.

Процедурата на изпитване е предназначена за картофени клубени и растения с типични или предполагаеми симптоми на кафяво гниене или бактериално изсъхване. Тя включва бърз скринингов тест, изолиране на патогена от инфектираната проводяща тъкан върху (селективна) среда и в случай на положителен резултат, идентифициране на културата като *Ralstonia solanacearum*.



(1) Описание на симптомите е дадено в раздел II.1.

(2) Бързите скринингови тестове улесняват предварителната диагностика, но не са основни. Отрицателните резултати не са гаранция за отсъствието на патогена.

(3) Тест за изтичане на бактериална нишка от проводящата тъкан на стъблото (раздел VI.A.1).

(4) Тест за установяване на поли-β-хидроксипутират гранули в бактериалните

клетки (раздел VI.A.2).

(5) Тест сероаглутинация на бактериална нишка или екстракт от тъкани със симптоми (раздел VI.A.3).

(6) IF тест на бактериална нишка, суспендирана във вода или екстракт от тъкани със симптоми (раздел VI.A.5).

(7) FISH тест на бактериална нишка, суспендирана във вода или екстракт от тъкани със симптоми (раздел VI.A.7).

(8) ELISA тест на бактериална нишка, суспендирана във вода или екстракт от тъкани със симптоми (раздел VI.A.8).

(9) PCR тест на бактериална нишка, суспендирана във вода или екстракт от тъкани със симптоми (раздел VI.A.6).

(10) Патогенът се изолира лесно от растителни материали със симптоми върху хранителна среда с помощта на разреждания (раздел II.3).

(11) Морфологията на типичните колонии е описана в раздел II.3.г.

(12) Култивирането може да е неуспешно в напреднал стадий на инфекцията. Сапрофитните бактерии, които се развиват върху болните тъкани, могат да се развият много по-бързо от патогена или да забавят растежа му върху средата. Ако тестът за изолиране е отрицателен, но симптомите на заболяването са характерни, изолирането трябва да се повтори, за предпочитане чрез изолация върху селективни среди.

(13) Сигурната идентификация на чиста култура от предполагаеми изолати на *Ralstonia solanacearum* се постига чрез тестове, описани в раздел VI.B. Под-видовото характеризирание не е задължително, но е препоръчително за всеки нов случай.

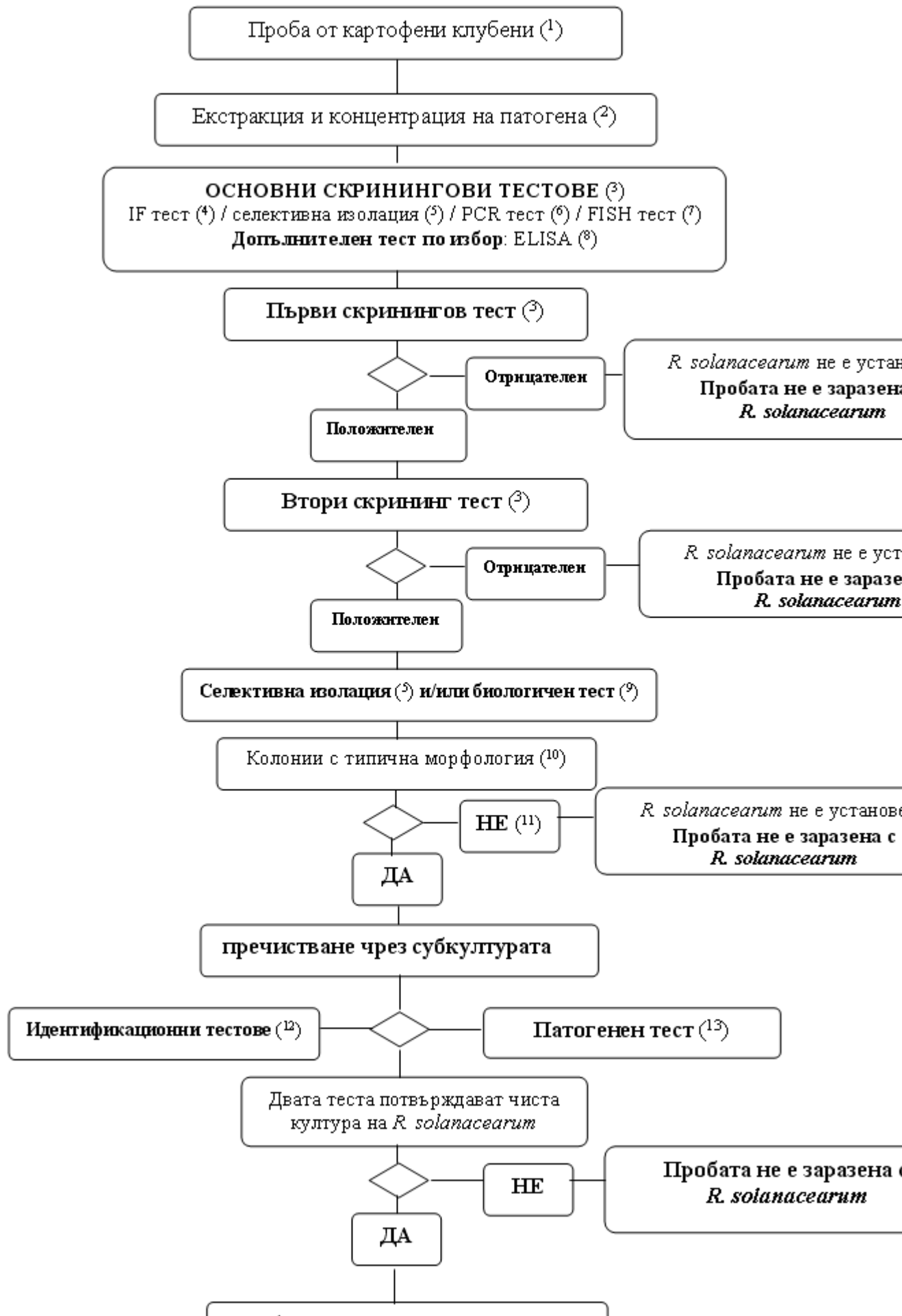
(14) Патогенният тест е описан в раздел VI.B.

2. Схема за установяване и идентифициране на *R. Solanacearum* в проби от картофени клубени без симптоми

Принцип:

Процедурата на изпитване е предназначена за откриване на латентни инфекции в картофени клубени. Положителен резултат от поне два скринингови теста (3), на базата на различни биологични принципи, трябва да се допълни от изолирането на патогена; последвано при изолирането на типични колонии от потвърждаването на чиста култура като *R. solanacearum*. Положителен резултат само от един от скрининговите тестове не е достатъчен, за да се счете пробата за съмнителна.

Скрининговите тестове и изолационните тестове трябва да позволяват откриване на 10³ до 10⁴ клетки/ml от повторно суспендираната утайка, включени като положителни контроли във всяка серия тестове.



(1) Стандартният размер на пробата е 200 клубена, въпреки че процедурата може да се използва за по-малки проби, ако не са налице 200 клубена.

(2) Описание на методите за екстракция и концентрация на патогена са дадени в раздел III.1.1.

(3) Ако най-малко два теста, на базата на различни биологични принципи, са положителни, трябва да се направи изолация и потвърждаване. Извършва се поне един скринингов тест. Когато той е отрицателен, се счита, че пробата е отрицателна. Когато той е положителен, трябва да се направи втори или няколко скринингови теста, на базата на различни биологични принципи, за да се провери първият положителен резултат. Ако вторият или другите тестове са отрицателни, се счита, че пробата е отрицателна. Не са необходими допълнителни тестове.

(4) Описание на IF тест е дадено в раздел VI.A.5.

(5) Описание на теста за селективна изолация е дадено в раздел VI.A.4.

(6) Описание на PCR тестове е дадено в раздел VI.A.6.

(7) Описание на FISH тест е дадено в раздел VI.A.7.

(8) Описание на ELISA тестове е дадено в раздел VI.A.8.

(9) Описание на биологичния тест е дадено в раздел VI.A.9.

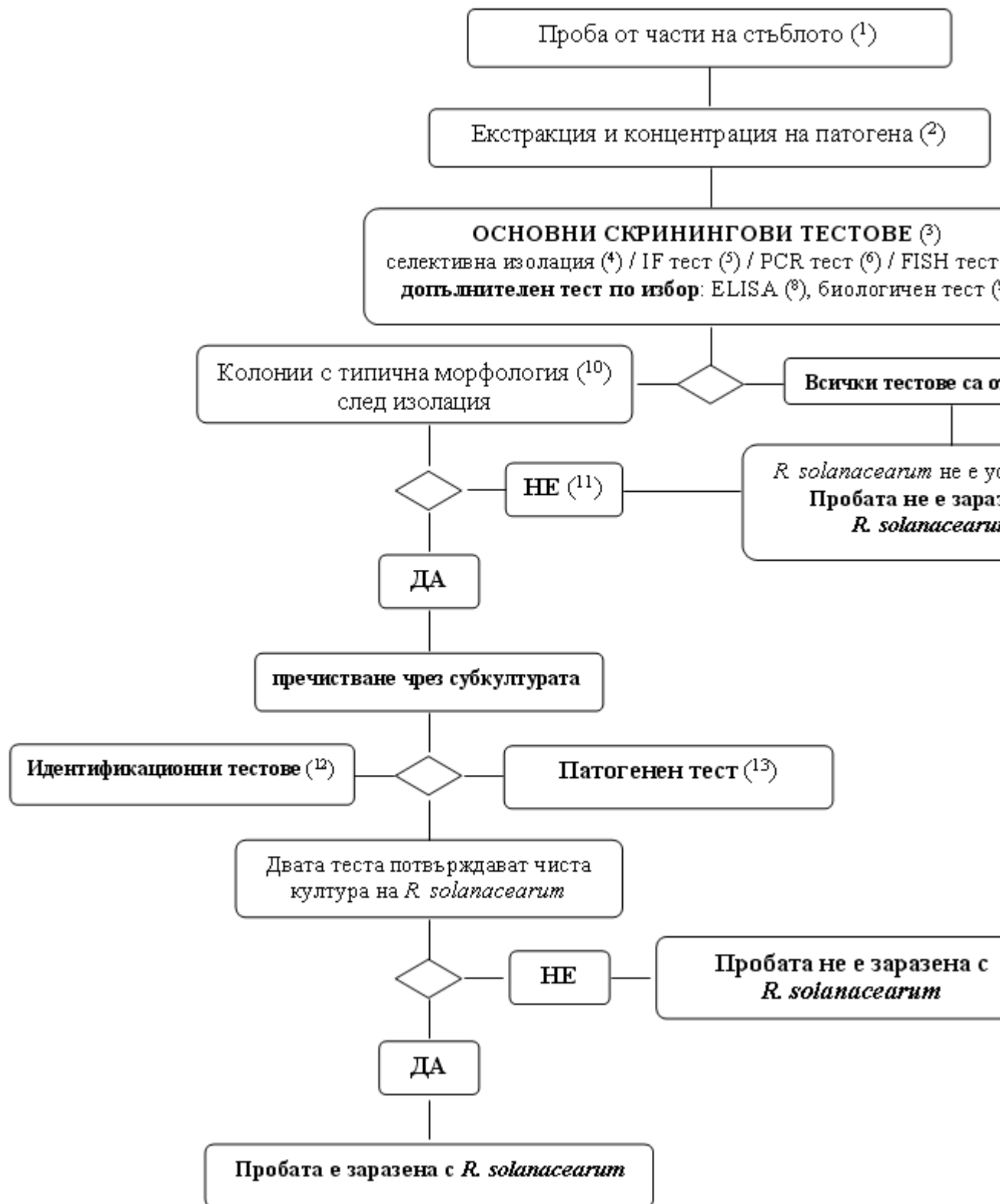
(10) Описание на типична морфология на колонията е дадено в раздел II.3.г.

(11) Култивирането на биологични проби може да не е успешно поради конкуриране или инхибиране от сапрофитни бактерии. Ако в скрининговите тестове са получени ясни положителни резултати, но тестовете за изолация са отрицателни, повторете тестовете за изолация от същата утайка или като вземете допълнително проводяща тъкан откъм столона от нарязани клубени от същата проба, а при необходимост се изпитват и допълнителни проби.

(12) Сигурната идентификация на чиста култура от предполагаеми изолати на *R. solanacearum* се постига, като се използват тестовете, описани в раздел VI.B.

(13) Описание на патогенния тест е дадено в раздел VI.B.

3. Схема за установяване и идентифициране на *Ralstonia solanacearum* в проби от картофени, домати или други растения гостоприемници без симптоми.



(1) Препоръчителният размер на пробата е даден в раздел III.2.1.

(2) Описание на методите за екстракция и концентрация на патогена е дадено в раздел III.2.1.

(3) Ако най-малко два теста, на базата на различни биологични принципи, са

положителни, трябва да се направи изолация и потвърждаване. Извършва се поне един скринингов тест. Когато той е отрицателен, се счита, че пробата е отрицателна. Когато той е положителен, трябва да се направи втори или няколко скринингови теста, на базата на различни биологични принципи, за да се провери първият положителен резултат. Ако вторият или другите тестове са отрицателни, се счита, че пробата е отрицателна. Не са необходими допълнителни тестове.

(4) Описание на теста за селективна изолация е дадено в раздел VI.A.4.

(5) Описание на IF тест е дадено в раздел VI.A.5.

(6) Описание на PCR тестове е дадено в раздел VI.A.6.

(7) Описание на FISH тест е дадено в раздел VI.A.7.

(8) Описание на ELISA тестове е дадено в раздел VI.A.8.

(9) Описание на биологичния тест е дадено в раздел VI.A.9.

(10) Описание на типична морфология на колонията е дадено в раздел II.3.г.

(11) Култивирането или биологичните тестове може да не са успешни поради конкуриране или инхибиране от сапрофитни бактерии. Ако в скрининговите тестове са получени ясни положителни резултати, но тестовете за изолация са отрицателни, повторете тестовете за изолация.

(12) Сигурната идентификация на чиста култура от предполагаеми изолати на *R. solanacearum* се постига, като се използват тестовете, описани в раздел VI.B.

(13) Описание на теста за патогенност е дадено в раздел VI.B.

Раздел II

Подробни методи за установяване и идентифициране на *R. solanacearum* в картофени клубени и картофени, домати или други растения гостоприемници със симптоми на бактериално кафяво гниене или бактериално увяхване

1. Симптоми (Виж Интернет страница <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>)

1.1. Симптоми по картофите

Картофено растение. Ранният стадий на инфекцията в полето се разпознава по увяхването на листата към върха на растението при високите температури през деня и възстановяване през нощта. При ранните стадии на повяхване листата се запазват зелени, но по-късно настъпва пожълтяване и кафява некроза. Появява се и епинастия. Повяхването на един стрък или на цели растения бързо става необратимо и води до падане и смърт на растението. Проводящата система при напречен пререз на стъблото на увехнали растения обикновено изглежда кафява и от разрязаната повърхност се отделя млечен бактериален ексудат или може да се отдели при стискане. Когато отрязаното стебло се постави вертикално във вода, от проводящите снопчета изтичат слизести нишки.

Картофени клубени. Картофените клубени трябва да се разрежат напречно близо до края на столона или надлъжно през края на столона. Ранният стадий на инфекцията се разпознава по стъклено жълтото до светлокафяво обезцветяване на проводящия пръстен, от който след няколко минути спонтанно се появява бледокремав бактериален ексудат. По-късно обезцветяването на проводящата тъкан става забележимо кафяво и некрозата може да обхване и паренхимната тъкан. При напредналите стадии инфекцията се разпространява навън от края на столона и очите, от които може да се отделя слизест бактериален ексудат, който предизвиква полепване

на частици от почвата. Върху кората могат да се появят червеникаво-кафяви леко хлътнали увредени участъци поради вътрешно разпадане на проводящата тъкан. Вторично развитие на гъбно и бактериално меко гниене се среща често при напредналите стадии на болестта.

1.2. Симптоми по домати

Доматено растение. Първият видим симптом е омекване на най-младите листа. При благоприятни за патогена условия на околната среда (почвени температури около 25°C; наситена влажност) настъпва епинастия и увяхване на едната страна или на цялото растение в рамките на няколко дни, което води до пълно падане на растението. При по-неблагоприятни условия на околната среда (почвени температури под 21°C) увяхването е по-малко, но могат да се развият голям брой адвентивни корени върху стеблото. Възможно е да се наблюдават набраздявания, пълни с вода, в основата на стеблото, което свидетелства за некроза на проводящата тъкан. При напречно разрязване на стеблото от обезцветената кафява проводяща тъкан се отделя бял или жълтеникав бактериален ексудат.

1.3. Симптоми по други гостоприемници

Растения на *Solanum dulcamara* и *S. nigrum*. При естествени условия рядко се наблюдават симптоми на увяхване при тези плевелни растения гостоприемници, освен ако температурите на почвата не надвишават 25°C или нивата на инокулация са изключително високи (например когато *S. nigrum* расте в близост до заразени домати или картофени растения). При настъпване на увяхване симптомите са същите както при домати. При неувяхващите растения на *Solanum dulcamara*, чиито стебла и корени растат във вода, може да се забележи вътрешно светлокафяво обезцветяване на проводящите тъкани при напречен разрез в основата на стеблото или частите на стеблото, които са под водата. От разрязаните проводящи тъкани или от слизестите нишки, ако отрязаното стебло се постави вертикално във водата, може да изтече филтрат с бактерии дори при отсъствие на симптоми за увяхване.

2. Бързи скринингови тестове

Бързите скринингови тестове могат да улеснят диагностицирането на вероятна зараза, но не са съществени. Използват се един или няколко валидирани теста от дадените по-долу:

2.1. Тест на изцеждане на стъблата

(Виж раздел VI.A.1.)

2.2. Установяване на поли-*b*-хидроксибутиратни (PHB) гранули

Гранулите PHB в клетките на *Ralstonia solanacearum* се визуализират след поставяне на капка от заразения тъкан и оцветяване с Нилско синьо А или със Суданска чернилка (Виж раздел VI.A.2)

2.3. Серологични аглутинационни тестове

(Виж раздел VI.A.3.)

2.4. Други тестове

Други подходящи скринингови тестове са: IF тест (виж раздел VI.A.5), FISH тест (виж раздел VI.A.7), ELISA тест (виж раздел VI.A.8) и PCR тест (виж раздел VI.A.6).

3. Процедура за изолиране

а) Взема се капка ексудат или участък обезцветена тъкан от проводящия пръстен на картофения клубен или от проводящите снопчета на стеблото от картофени, домати или други увехнали растения гостоприемници. Суспендира се в малък обем

стерилна дестилирана вода или 50 mM фосфатен буфер (допълнение 4) и се оставят за 5 до 10 минути.

б) Изготвя се серия десетични разреждания на суспензията.

в) 50 - 100 µl от суспензията и разрежданията се прехвърлят върху основна хранителна среда (NA, YPGA или SPA; виж допълнение 2) и/или тетразолиева среда на Келман (допълнение 2) и/или валидирана селективна среда (например SMSA; виж допълнение 2). Разстила се или се прави щрихово посяване с подходяща техника за разреждане. Ако е целесъобразно, се подготвят отделни блюда с разреждана клетъчна суспензия на *R. solanacearum* биовар 2 като положителна контрола.

г) Блюдата се инкубират за период от 2 до 6 дни при 28°C.

- Върху основните хранителни среди вирулентните изолати на *R. solanacearum* развиват перлени кремаво-бели плоски, течни колонии с неправилна форма, често с характерни розетки в центъра. Авирулентните форми на *R. solanacearum* образуват малки, кръгли, по-слабо разлети, маслени колонии, които са изцяло кремаво-бели.

- Върху тетразолиева среда на Келман и SMSA колониите са с кървавочервен център. Авирулентните форми на *R. solanacearum* образуват малки, кръгли, по-слабо разлети, маслени колонии, които са изцяло тъмноревени.

4. Идентификационни тестове за *R. solanacearum*

Тестове за потвърждаване идентичността на предполагаеми изолати на *R. solanacearum* са дадени в раздел VI.Б.

Раздел III

1. Подробни методи за установяване и идентифициране на *R. solanacearum* в проби от картофени клубени без симптоми

1.1. Подготовка на пробата

Забележка:

- Размерът на стандартната проба е 200 клубена за едно изпитване. По-интензивното пробовземане изисква повече тестове върху проби с такъв размер. По-големият брой на клубените в пробата води до инхибиране или трудности при интерпретиране на резултатите. Но процедурата е удобна за използване при проби с по-малко от 200 клубена, когато наличните клубени не достигат.

- Валидирането на всички методи за установяване на наличие, описани по-долу, става на базата на изпитване на проби от 200 клубена.

- Картофеният екстракт, описан по-долу, може също да се използва за установяване наличието на бактерията *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus*, причиняваща пръстеновидно гниене по картофите.

Незадължително предварително третиране преди подготовката на пробата:

а) Инкубация на пробите при 25 до 30°C за период до две седмици преди изпитването с цел насърчаване на мултиплицирането на евентуални популации на *R. solanacearum*.

б) Измиване на клубените. Използват се подходящи дезинфектанти (хлорни съединения, когато ще се използва PCR тест, за да се отстрани патогенната ДНК) и детергенти между всяка проба. Клубените се изсушават на въздух. Тази процедура за измиване е особено полезна (но не е задължителна) за силно замърсени с пръст проби или ако трябва да се направи PCR тест или процедура за директна изолация.

1.1.1. Отстранява се с чист и дезинфекциран скалпел или нож за зеленчуци

кората в края откъм столона на всеки клубен така, че да се вижда проводящата тъкан. Внимателно се изрязва малка част (конус) от проводящата тъкан в края откъм столона с минимално количество непроводяща тъкан. (Виж Интернет страница <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Забележка: Отделят се всички (загнили) клубени с предполагаеми симптоми на кафяво гниене и се изпитват отделно.

Ако при вземането на конус се наблюдават симптоми на кафяво гниене, се прави визуална проверка на клубена и той се разрязва близо до края откъм столона. Всеки разрязан клубен с предполагаеми симптоми трябва да се запази най-малко два дена при стайна температура, за да се създаде възможност за суберизация, и да се съхрани в хладилник (при температури от 4 до 10°C) при подходящи карантинни условия. Всички клубени, включително тези с предполагаеми симптоми, се съхраняват в съответствие с изискванията на Приложение III.

1.1.2. Събират се конусчетата в неизползвани съдове за еднократна употреба, които могат да се затварят и/или запечатват (ако се използват повторно, съдовете трябва да се почистят основно и да се дезинфекцират с хлорни съединения). За предпочитане е конусите да се обработят незабавно. Когато това не е възможно, те се съхраняват в съда, без да се прибавя буфер, в хладилник за не повече от 72 часа или за 24 часа при стайна температура.

Конусите се обработват с една от следните процедури:

а) Конусите се покриват с достатъчно количество (около 40 ml) екстракционен буфер (Допълнение 4) и се разбъркват на ротационна клатачна машина (50 - 100 rpm) в продължение на 4 часа при температура под 24°C или в продължение на 16 до 24 часа охладени,

или

б) Конусите се хомогенизират с достатъчно количество (около 40 ml) екстракционен буфер (допълнение 4) или в блендер (например Waring или Ultra Thruax) или чрез стриване в запечатана торбичка за мацерация за еднократна употреба (например Stomacher или Bioreba от усилен полиетилен, 150 mm x 250 mm; стерилизирана чрез облъчване), като се използва гумен чук или подходящ апарат за мелене (например Nomex).

Забележка: При използване на блендер за хомогенизиране има голяма опасност от кръстосано заразяване на пробите. Необходимо е да се вземат предпазни мерки, за да се избегне създаването на аерозоли или разливане по време на процеса на екстракция. За всяка проба се осигуряват пряко стерилизирани ножове на блендера и съдове. Ако ще се използва PCR тест, избягвайте пренасянето на ДНК върху съдовете и апаратите за мелене. Препоръчва се стриване в торбички за еднократна употреба и използването на еднократни епруветки, когато ще се използва PCR.

1.1.3. Прелива се супернатанта. Ако течността е много мътна, се налага избистряне чрез центрофугиране при ниска скорост (при не повече от 180 g за 10 минути при температура между 4 и 10°C) или чрез вакуумна филтрация (40 до 100 µm), като филтърът се измива с допълнителен (около 10 ml) екстракционен буфер.

1.1.4. Концентрира се бактериалната фракция чрез центрофугиране при 7000 g за 15 минути (или 10 000 g за 10 минути) при температура между 4 и 10°C и се отстранява супернатантата, без да се нарушава утайката.

1.1.5. Повторно се суспендира утайката в 1,5 ml буфер за разтваряне на утайката (допълнение 4). Използват се 500 µl за тестване за *R. solanacearum*, 500 µl за *Clavibacter*

michiganensis subsp. *sepedonicus* и 500 µl за сравняване. Добавя се стерилен глицерин до окончателна концентрация от 10 до 25 % (v/v) към 500 µl от референтната аликвотна част и към останалата аликвотна част за изпитване, разбърква се и се оставя при температура от -16 до -24°C (седмици) или от -68 до -86°C (месеци). Аликвотните части за изпитване се съхраняват при температура от 4 до 10°C по време на изпитването.

Не се препоръчва многократно замразяване и размразяване на пробите.

Ако се налага транспортиране на екстракта, осигурява се доставка в охладена кутия в рамките на 24 до 48 часа.

1.1.6. Задължително е отделното третиране на всички *R. solanacearum* положителни контроли и проби, за да се избегне заразяване. Това се отнася за предметните стъкла за IF тест и за всички други тестове.

1.2. Изпитване

Виж схемата и описанието на тестовете и оптимизираните протоколи в съответните допълнения:

Селективна изолация (виж раздел VI.A.4)

IF тест (виж раздел VI.A.5)

PCR тестове (виж раздел VI.A.6)

FISH тест (виж раздел VI.A.7)

ELISA тестове (виж раздел VI.A.8)

Биологичен тест (виж раздел VI.A.9)

2. Подробни методи за установяване и идентифициране на *R. solanacearum* в проби от картофени, домати или други растения без симптоми

2.1. Подготовка на пробата

Забележка: За установяване наличието на латентни популации на *R. solanacearum* се препоръчва използването на съставни проби. Процедурата е удобна за използване при съставни проби от не повече от 200 стъблени части. Когато се правят мониторингови наблюдения, те трябва да се базират на статистическа представителна извадка на изследваната растителна популация.

2.1.1. Събират се части от стеблото с дължина 1 до 2 cm в затворен стерилен съд в съответствие със следната процедура за пробовземане:

Доматен разсад от оранжерии: С чист дезинфекциран нож се отстранява сегмент с дължина 1 cm от основата на всяко стъбло точно над нивото на почвата.

Полски или парникови домати растения: С чист дезинфекциран нож се отстранява най-ниското странично клонче на всяко растение, като се реже точно над връзката с главното стъбло. Отстранява се сегмент с дължина 1 cm от най-долната част на всяко странично клонче.

Други гостоприемници: С чист дезинфекциран нож или градинарски ножици се отстранява сегмент с дължина 1 cm от основата на всяко стъбло точно над нивото на почвата. При *S. dulcamara* или други растения гостоприемници, които виреят във вода, се отстраняват участъци с дължина 1 - 2 cm от частта на стъблото под водата или от ластуните, пуснали корени във водата.

Когато се взимат проби от определено място, се препоръчва да се изпитва статистическа представителна извадка, съставена от най-малко 10 растения от всяко място на пробовземане за всеки потенциален плевелен гостоприемник. Установяването на наличие на патоген е най-надеждно през късна пролет, лятото и есента, въпреки че естествените инфекции могат да се откриват през цялата година в многогодишни *Solanum dulcamara*, растящи в реките. Познатите гостоприемници включват саморасли

картофени растения (задържащи почвата), *Solanum dulcamara*, *S. nigrum*, *Datura stramonium* и други членове на семейство *Solanaceae*. Други гостоприемници са *Pelargonium* spp. и *Portulaca oleracea*. Някои европейски плевелни видове, които потенциално могат да задържат популации на *R. solanacearum* биовар 2/Race 3 в корени и/или ризосфери при специфични условия на околната среда, включват *Atriplex hastata*, *Bidens pilosa*, *Cerastium glomeratum*, *Chenopodium album*, *Eupatorium cannabinum*, *Galinsoga parviflora*, *Ranunculus scleratus*, *Rorippa* spp, *Rumex* spp., *Silene alba*, *S. nutans.*, *Tussilago farfara* и *Urtica dioica*.

Забележка: Визуалната проверка за установяване на вътрешни симптоми (оцветяване на проводящите тъкани или бактериален ексудат) може да се направи на този етап. Всички сегменти от стъблото със симптоми се отделят и се изпитват отделно (Виж раздел II).

2.1.2. Сегментите от стъблото се дезинфекцират за кратко със 70 % етанол и веднага се подсушават върху попивателна хартия. След това сегментите от стъблото се обработват с помощта на една от следните процедури:

а) Сегментите се покриват с достатъчно количество (около 40 ml) екстракционен буфер (допълнение 4) и се разбъркват на ротационна клатачна машина (50 - 100 rpm) в продължение на четири часа при температура под 24°C или в продължение на 16 до 24 часа охладени, или

б) Сегментите се обработват незабавно чрез стриване в здрава торбичка за мацерация (например *Stomacher* или *Bioreba*) с достатъчно количество екстракционен буфер (допълнение 4), като се използва гумен чук или подходящ апарат за мелене (например *Homex*). Ако това е невъзможно, сегментите от стъблото се съхраняват охладени не повече от 72 часа или не повече от 24 часа при стайна температура.

2.1.3. След 15 минути утаяване се взема течността.

2.1.4. Обикновено не се налага допълнително избистряне на екстракта или концентриране на бактериалната фракция, но се постигат чрез филтриране и/или центрофугиране, описани в раздел III.1.1.3 - 1.1.5.

2.1.5. Неразреденият или концентриран екстракт се разделя на две равни части. Едната част се поддържа при температура от 4 до 10°C по време на изпитването, а другата се съхранява с 10 до 25 % (v/v) стерилен глицерин - при температура от -16 до -24°C (седмици) или от -68 до -86°C (месеци), в случай че се наложи допълнително изпитване.

2.2. Изпитване

Виж схемата и описанието на тестовете и оптимизираните протоколи в съответните допълнения:

Селективна изолация (виж раздел VI.A.4)

IF тест (виж раздел VI.A.5)

PCR тестове (виж раздел VI.A.6)

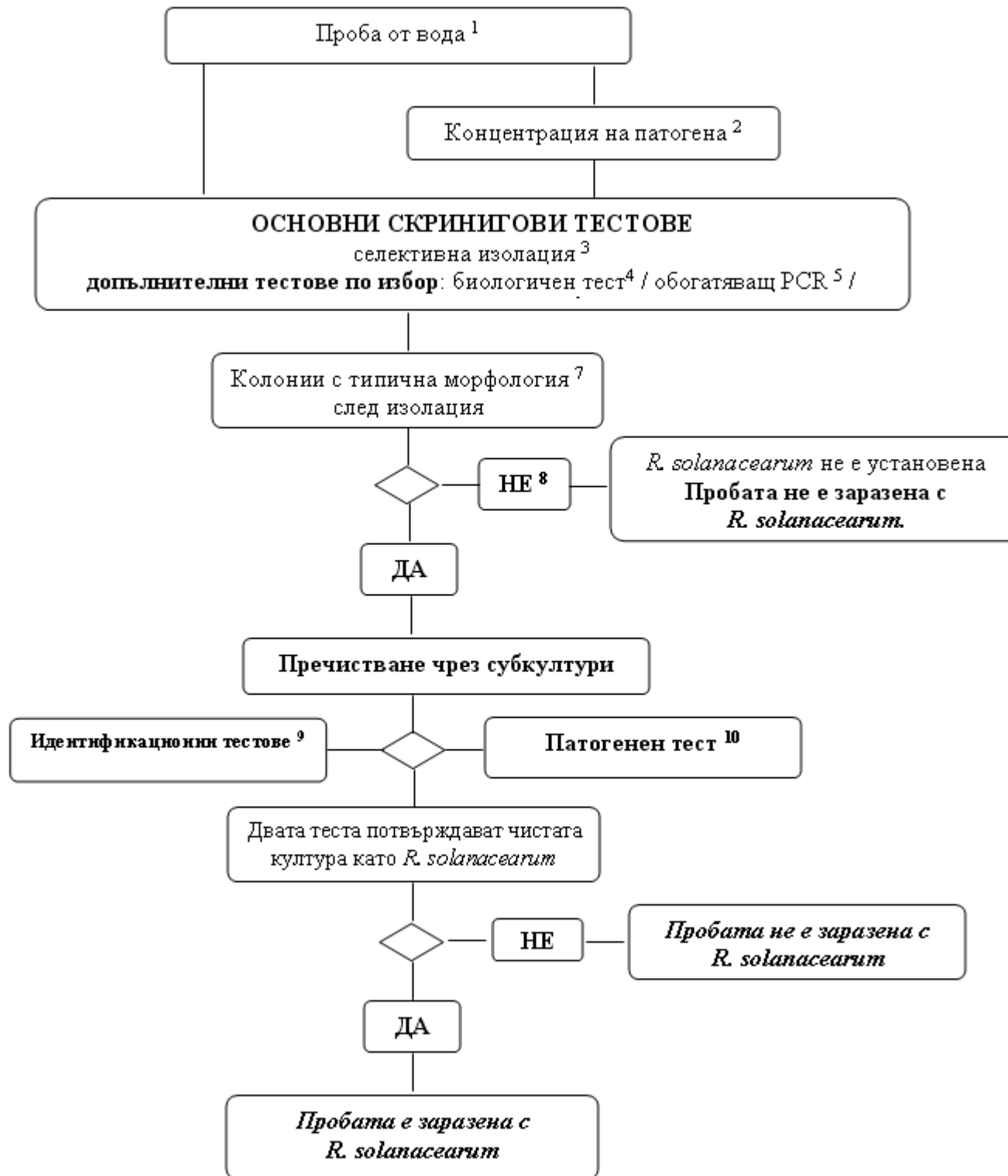
FISH тест (виж раздел VI.A.7)

ELISA тестове (виж раздел VI.A.8)

Биологичен тест (виж раздел VI.A.9)

Раздел IV

1. Схема за установяване и идентифициране на *R. solanacearum* във вода



(1) Препоръчителните процедури за пробовземане са дадени в раздел IV.2.1.

(2) Описание на методите за концентрация на патогена е дадено в раздел IV.2.1. Концентрацията увеличава популациите както на патогена, така и на конкурентните сапрофитни бактерии и се препоръчва само ако не води до инхибиране на изолационния тест.

- (3) Описание на теста за селективна изолация е дадено в раздел VI.A.4.
- (4) Описание на теста на биологична проба е дадено в раздел VI.A.9.
- (5) Описание на PCR методи за обогатяване е дадено в раздел VI.A.4.2 и раздел VI.A.6.
- (6) Описание на ELISA методи за обогатяване е дадено в раздел VI.A.4.2 и VI.A.8.
- (7) Описание на типична морфология на колония е дадено в раздел II.3.г.
- (8) Култивирането може да не е успешно поради конкуриране или инхибиране от сапрофитни бактерии. Ако има вероятност големият брой сапрофитни популации да се отразят неблагоприятно на надеждността на изолацията, тестът за изолация се повтаря след разреждане на пробата в стерилна вода.
- (9) Надеждно идентифициране на чисти предполагаеми култури на *R. solanacearum* се постига, като се използват тестовете, описани в раздел VI.B.
- (10) Описание на теста за патогенност е дадено в раздел VI.B.

2. Методи за установяване и идентифициране на *R. solanacearum* във вода

Принцип

Валидираната схема за установяване наличието на бактерията, описана в настоящия раздел, се прилага за установяване на патоген в проби от повърхностна вода и може също да се прилага за изпитване на проби от води от преработка на картофи или отпадни води. Важно е, обаче, да се отбележи, че очакваната чувствителност на установяването на наличие се променя в зависимост от субстрата. Чувствителността на теста за изолация се влияе от популациите конкурентни сапрофитни бактерии, които по принцип са много повече във водите от преработка на картофи и в отпадъчните води, отколкото в повърхностните води. Въпреки че от схемата, дадена по-долу, се очаква да установи не по-малко от 10³ клетки на литър в повърхностни води, чувствителността на установяването на наличие във водите от преработка на картофи и в отпадните води е значително по-ниска. Поради тази причина се препоръчва изпитването на отпадни води да става след всяко третиране за пречистване (напр. утаяване или филтриране), при което се редуцират популациите на сапрофитни бактерии. Ограниченията в чувствителността на схемата за изпитване трябва да се имат предвид, когато се оценява надеждността на получени отрицателни резултати. Въпреки че схемата се използва успешно при наблюдения за определяне на наличие или отсъствие на патогена в повърхностни води, нейните ограничения трябва да се имат предвид, когато схемата се използва в подобни наблюдения на води от преработка на картофи или отпадни води.

2.1. Подготовка на пробата

Забележка:

- Установяването на *R. solanacearum* в повърхностни води е най-надеждно през късна пролет, лятото и есента, когато температурата на водата надвишава 15°C.
- Многократното пробовземане по различно време през периода, упоменат по-горе, на определени места за пробовземане увеличава надеждността на установяването, като намалява влиянието на промените в климата.
- Необходимо е да се вземе предвид въздействието на силните валежи и географията на реките, за да се избегнат последствията от продължително разреждане, които могат да замъглят наличието на патогена.
- Пробите от повърхностни води се вземат в близост до растенията гостоприемници, ако има такива.

2.1.1. На избраните за пробовземане места се събират проби чрез напълване на

стерилни епруветки или бутилки на дълбочина по възможност под 30 cm и до 2 m от брега. За водите от преработка и отпадните води пробите се събират на мястото на изхвърляне. Препоръчва се размерът на пробите за едно място на пробовземане да бъде до 500 ml. Ако се предпочитат по-малки проби, се препоръчва пробовземането да стане поне на три пъти за всяко място на пробовземане, като всяка проба е съставена от две еднакви подпроби по 30 ml най-малко. При интензивни наблюдения се избират поне три места на пробовземане през 3 km по речното течение, като се осигурява пробовземане и от притоците, които се вливат в реката.

2.1.2. Пробите се транспортират на хладно и тъмно (4 до 10°C) и се изпитват в рамките на 24 часа.

2.1.3. При необходимост бактериалната фракция може да бъде концентрирана, като се използва един от следните методи:

а) 30 до 50 ml подпроби се центрофугират при 10 000 g за 10 минути (или 7000 g за 15 минути) за предпочитане при температури от 4 до 10°C, отстранява се надутайката и повторно се суспендира утайката в 1 ml буфер за разтваряне на утайката (допълнение 4).

б) Мембранна филтрация (минимален размер на порите 0,45 µm), последвана от измиване на филтъра в 5 до 10 ml буфер за разтваряне на утайката и запазване на отмитото. Този метод е подходящ за големи количества вода, съдържащи малък брой сапрофити.

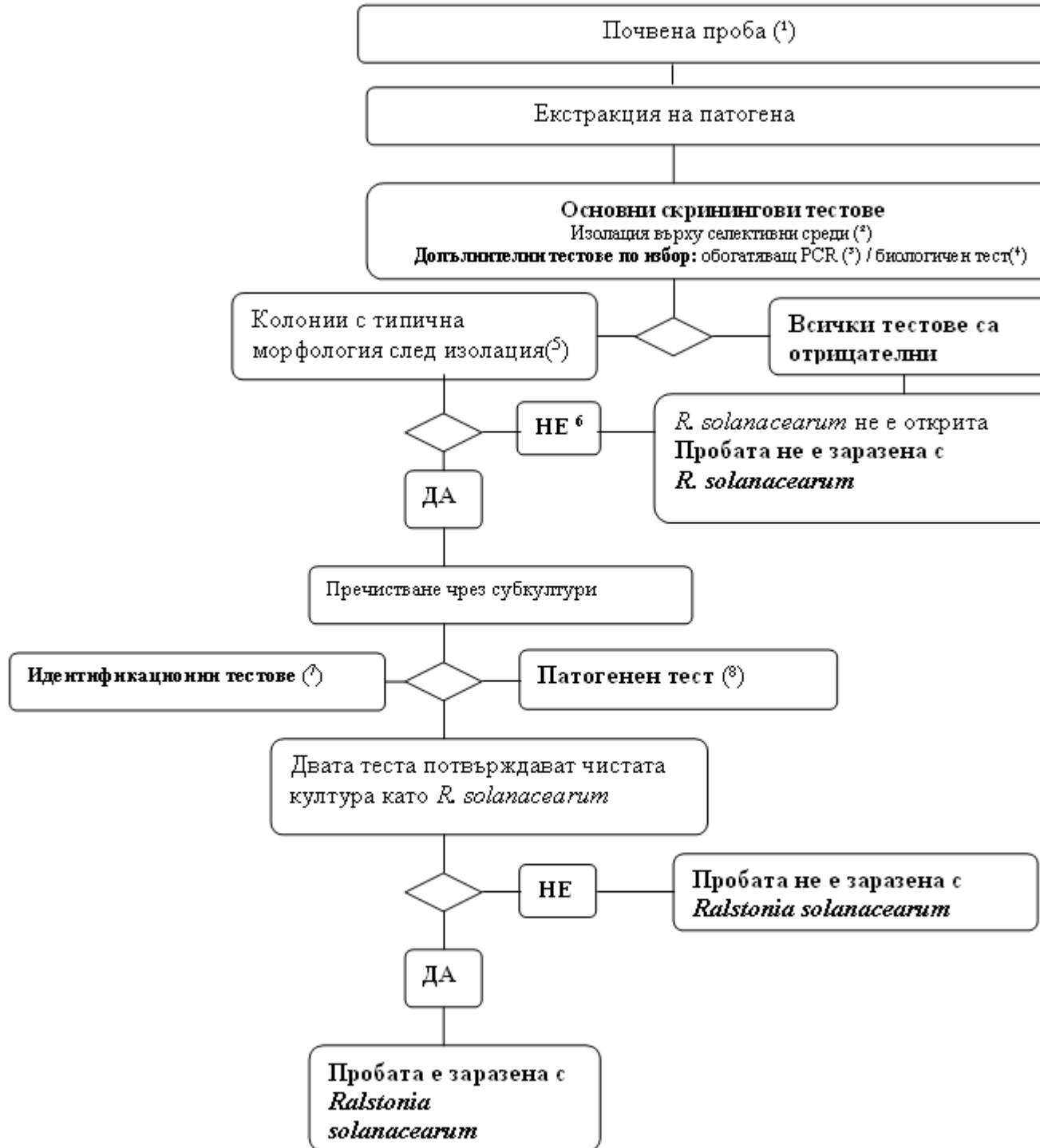
Концентрирането обикновено не се препоръчва за проби от преработка и отпадните води, тъй като увеличените популации на конкурентните сапрофитни бактерии ще инхибират установяването на *Ralstonia solanacearum*.

2.2. Изпитване

Виж схемата и описанието на тестовете в съответните допълнения.

Раздел V

1. Схема за установяване и идентифициране на *R. solanacearum* в почва



(1) Препоръчителните процедури за пробовземане са дадени в раздел IV.2.1.

(2) Описание на методите за концентрация на патогена е дадено в раздел IV.2.1. Концентрацията увеличава популациите както на патогена, така и на конкурентните сапрофитни бактерии и се препоръчва само ако не води до инхибиране на изолационния тест.

(3) Описание на теста за селективна изолация е дадено в раздел VI.A.4.

(4) Описание на теста на биологична проба е дадено в раздел VI.A.9.

(5) Описание на PCR методи за обогатяване е дадено в раздел VI.A.4.2 и раздел VI.A.6.

(6) Описание на ELISA методи за обогатяване е дадено в раздел VI.A.4.2 и VI.A.8.

(7) Описание на типична морфология на колония е дадено в раздел II.3.г.

(8) Култивирането може да не е успешно поради конкуриране или инхибиране от сапрофитни бактерии. Ако има вероятност големият брой сапрофитни популации да се отразят неблагоприятно на надеждността на изолацията, тестът за изолация се повтаря след разреждане на пробата в стерилна вода.

(9) Надеждно идентифициране на чисти предполагаеми култури на *R. solanacearum* се постига, като се използват тестовете, описани в раздел VI.B.

(10) Описание на теста за патогенност е дадено в раздел VI.B.

2. Методи за установяване и идентифициране на *R. solanacearum* в почва

Принципи

Валидираната схема за установяване наличието на бактерията, описана в настоящия раздел, се прилага за установяване на патоген в проби от почва, но може също да се прилага за изпитване на проби от твърди отпадъци от преработката на картофи или утайки от отпадъчни води. Но е необходимо да се отбележи, че тези методи не са достатъчно чувствителни, за да се гарантира установяване на малък брой и/или разпръснати популации на *R. solanacearum*, които могат да се срещат в естествено заразени проби на такива субстрати.

Ограниченията в чувствителността на тази схема за изпитване трябва да се имат предвид, когато се оценява надеждността на получени отрицателни резултати, а също и когато се използва в изследвания за определяне на наличие или отсъствие на патогена в почви или утайки. Най-надеждният тест за наличието на патогена в полски почви е да се засади чувствителен гостоприемник и да се наблюдава за поява на инфекция, но дори и при този метод може да убегне установяването на ниски нива на заразяване.

2.1. Подготовка на пробата

2.1.1. Взимането на почвени проби от полето трябва да следва стандартните принципи, използвани за пробовземане на нематоди. Събира се 0,5 до 1 kg почва за една проба от 60 места на 0,3 ha на дълбочина от 10 до 20 cm (или в мрежа 7 x 7 метра). Ако е налице съмнение за наличие на патогена, броят на местата на пробовземане се увеличава до 120 на 0,3 ha. Пробите се държат на температура от 12 до 15°C преди изпитването. Взимането на проби от утайки от преработката на картофи и от канализацията става чрез събиране на общо 1 kg от местата, което представлява общото количество утайка за изпитване. Всяка проба се разбърква добре преди изпитване.

2.1.2. Пробите от 10 до 25 g почва или утайка се диспергират чрез въртене и разклащане (250 rpm) в 60 до 150 ml буфер за екстракция (Допълнение 4) в продължение на не повече от два часа. При необходимост диспергирането може да се улесни, като се добави 0,02 % стерилен Tween-20 и 10 до 20 g стерилен едрозърнест пясък.

2.1.3. По време на изпитване се поддържа температура на суспензията от 4°C.

2.2. Изпитване

Виж схемата и описанието на тестовете в съответните допълнения.

Раздел VI

Оптимизирани протоколи за установяване и идентифициране на *R. solanacearum*

А. Тестове за диагностициране и установяване

1. Тест на изцеждане на стъблото

Наличието на *R. solanacearum* в стъблата на увехнали картофени, домати и други растения гостоприемници може да се установи с помощта на следното просто вероятно изпитване: Стъблото се отрязва точно над нивото на почвата. Отрязаната повърхност се потапя в епруветка с чиста вода. Наблюдава се дали след няколко минути от отрязаните проводящи сночета ще се появи характерно спонтанно изтичане на бактериални слизести нишки.

2. Установяване на поли-*b*-хидроксибутиратни гранули

1. Приготвя се натривка от бактериален ексудат от инфектирана тъкан или от 48-часова култура върху YPGA или SPA среда (Допълнение 2) върху предметно стъкло.

2. Приготвят се натривки от положителни контролни от биовар 2 на *R. solanacearum* и ако сметете за необходимо, натривка за отрицателна контрола от вид, за който се знае, че е РНВ отрицателен.

3. Остава се да изсъхне. Долната повърхност на предметното стъкло се прекарва няколко пъти бързо през пламък, за да се фиксира натривката.

4. Препаратът се оцветява с Нилско синьо (Nile Blue) или Суданско черно (Sudan Black) и се наблюдава под микроскоп, както е описано по-долу:

Тест с Нилско синьо:

(а) Залива се фиксираната натривка с 1% воден разтвор на Нилско синьо А и се инкубира за 10 минути при 55°C.

(б) Отлива се оцветяващият разтвор. Всяко предметно стъкло се измива внимателно на течаща вода. Излишната вода се отстранява с книжна салфетка.

(в) Натривката се залива с 8 % воден разтвор на оцетна киселина и се инкубира за една минута при стайна температура.

(г) Промива се леко под течаща вода. Подсушава се върху книжна салфетка.

(д) Навлажнява се отново с капка вода и се поставя покривно стъкло.

(е) Оцветената натривка се разглежда с епифлуоресцентен микроскоп при 450 nm под имерсионно масло при увеличение от 600x до 1000x, като се използва маслен-или водоимерсионен обектив.

(ж) Наблюдава се за яркооранжева флуоресценция на РНВ гранулите. Извършват се също и наблюдения при естествена светлина, за да се провери вътреклетъчният характер на гранулите и дали клетъчната морфология е типична за *R. solanacearum*.

Тест със Суданово черно (Sudan Black):

(а) Фиксираната натривка се залива с 0,3 % разтвор на Суданово черно В в 70 % етанол и се инкубира за 10 минути при стайна температура.

(б) Отлива се оцветяващият разтвор. Промива се за кратко време под течаща водна струя, като излишната вода се отстранява с книжна салфетка.

(в) Натривката се потапя за кратко време в ксилол. Подсушава се върху книжна салфетка.

Внимание! Ксилолът е вреден продукт. Работете в камина.

(г) Потопете натривката във воден разтвор 0,5 % (тегловно-обемен) на сафранин и оставете 10 секунди на стайна температура.

Внимание! Сафранинът е вреден продукт. Работете в камина.

(д) Промива се за кратко време под леко течаща вода, подсушава се върху филтърна хартия и се поставя покривно стъкло.

(е) Оцветената натривка се разглежда със светлинен микроскоп под имерсия и увеличение 1000x, като се използва маслено-имерсионен обектив.

(ж) Гранулите РНВ, налични в клетките на *Ralstonia solanacearum*, се оцветяват в синьо-черно. Клетъчната стена се оцветява в розово.

3. Тест Серааглутинация

Аглутинацията на клетки на *R. solanacearum* в бактериален ексудат или симптоматични тъканни екстракти се наблюдава най-добре, като се използват валидирани антитела (виж Допълнение 3), етикетирани с маркери с подходящ цвят, например червено за клетки на *Staphylococcus aureus* или цветни латексови частици. Когато се използва кит, закупен в търговската мрежа (виж Допълнение 3), се спазват указанията на производителя. В противен случай се извършва следната процедура:

а) Смесват се капки от суспензия на етикетирано антитяло и бактериален ексудат или суспензия (приблизително 5 µl от всяко) в кладенчета на стъкла за IF.

б) Приготвят се положителни и отрицателни контроли, като се използва суспензия на *R. solanacearum* биовар 2 и несъответстващ шам.

в) Наблюдава се за аглутинация в положителни проби след внимателно разбъркване за 15 секунди.

4. Изолация върху селективни среди

4.1. Посявка в петрита

Забележка. Преди да се използва този метод за пръв път, се извършват предварителни тестове, за да се гарантира възпроизводимостта на установяване на 10³ до 10⁴ клетки, образуващи колонии на *R. solanacearum*, на ml, добавени към екстракти от проби, които са дали отрицателен резултат при предишно тестване.

Използва се съответстващо утвърдена селективна среда, като например SMSA (модифицирана от Elphinstone et al., 1996 г.; виж Допълнение 2).

Изисква се внимание, за да се разграничи *R. solanacearum* от други бактерии, които могат да развият колонии върху средата. Освен това coloniите от *R. solanacearum* могат да покажат атипична морфология, ако в петритата присъстват и бактерии антагонисти. Когато има съмнение за последствия от антагонизъм, пробата следва да се тества повторно, като се използва друг различен тест.

Най-висока чувствителност на установяване чрез този метод може да се очаква, когато се използват пряко приготвени екстракти от проби. Но методът е приложим и при използването на екстракти, които са били съхранявани в глицерин при температура от -68 до -86°C.

За положителни контроли се приготвят десетократни разреждания от суспензия на 10⁶ клетки на ml от вирулентен шам, биовар 2 на *R. solanacearum* (например NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBR 3857). За да се избегне всяка възможност за заразяване, положителните контроли се приготвят отделно от пробите за тестване.

За всяка приготвена партида селективна среда задължително се изпитва нейната пригодност за растеж на патогена, преди да се използва за тестване на проби.

Контролният материал се изпитва по същия начин както пробата/пробите.

4.1.1. Изпълнява се подходяща техника за посявка върху петри, като целта е да се отстранят, чрез разреждането фона на сапрофитните популации. Разпределят се 50 - 100 µl за петри от екстракта на пробата и всяко разреждане.

4.1.2. Петритата се инкубират при 28°C. Отчитането на петритата става след 48

часа, а след това ежедневно до 6 дни. Типичните *R. solanacearum* колонии върху SMSA среда са млечнобели, плоски, с неправилна форма, течни и след тридневна инкубация развиват розово до кървавочервено оцветяване в центъра с вътрешно набраздяване (виж интернет страница <http://forum.europra.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Забележка. Върху тази среда понякога се образуват атипични колонии. Те може да са малки, кръгли, само червени на цвят и нефлуидни или само отчасти флуидни и затова трудно се различават от колониите на сапрофитните бактерии.

4.1.3. Вероятните колонии на *R. solanacearum* след посевка, като шрих или разреждане в петри, се пречистват върху обща хранителна среда, за да се получат единични колонии (виж Допълнение 2).

4.1.4. Културите се съхраняват краткосрочно в стерилна вода (pH от 6 до 8, без съдържание на хлор) при стайна температура на тъмно или дългосрочно в подходяща криозащитна среда при -68 до -86°C или лиофилизирани.

4.1.5. Определят се вероятните култури (виж раздел VI.Б) и се извършва тест за патогенност (виж раздел VI.В).

Интерпретиране на резултатите от посевката в петри

Тестът е отрицателен, ако не се наблюдават никакви бактериални колонии след шест дни или ако не са открити никакви типични колонии за *R. solanacearum*, при условие че не се очаква вероятно инхибиране от други бактерии, и са намерени типични за *R. solanacearum* колонии в петритата с положителните контроли.

Тестът е положителен, ако са изолирани типични за *R. solanacearum* колонии.

4.2. Процедура на обогатяване

Използва се утвърдена среда за обогатяване, като например видоизменена хранителна среда на Wilbrink broth (виж Допълнение 2).

Тази процедура може да се използва за селективно увеличаване на популациите на *R. solanacearum* в екстрактите от проби и за увеличаване на чувствителността на откриване. Процедурата също така ефективно разрежда инхибиторите на PCR реакцията (1:100). Но следва да се обърне внимание, че обогатяването на *R. solanacearum* може да се провали поради антагонизма на сапрофитни организми, които често се обогатяват едновременно. Поради тази причина изолирането на *R. solanacearum* от обогатени хранителни култури може да се затрудни. Освен това, тъй като популациите на серологично свързани сапрофити могат да се увеличат, се препоръчва използването на специфични моноклонални антители пред поликлоналните антители, когато ще се използва ELISA тест.

4.2.1. За обогатяване чрез PCR 100 µl от екстракта на пробата се прехвърлят в 10 ml хранителна среда за обогатяване (виж Допълнение 2), предварително разпределена в епруветки и колби без наличие на ДНК. За обогатяване чрез ELISA тест могат да се използват по-високи съотношения на екстракта към хранителната среда (например 100 µl в 1,0 ml хранителна среда за обогатяване).

4.2.2. Културите се инкубират за 72 часа при температура от 27 до 30°C на клатачка или в статично положение, като капачките не са плътно затворени, за да има възможност за аерация.

4.2.3. Разбърква се добре преди ELISA или PCR тестовете.

4.2.4. Обогатената хранителна среда се третира по същия начин както пробата/пробите в тестовете по-горе.

Забележка. Ако се очаква инхибиране на обогатяването на *R. solanacearum* поради високи популации на някои конкурентни сапрофитни бактерии, обогатяването

на екстрактите от пробите с центрофугиране или други форми на концентрация може да дадат по-добри резултати.

5. IF тест

Принцип

Използването на IF теста като основен скринингов тест е препоръчително поради доказаната му сила при постигане на задължителните прагове.

Когато IF тестът е използван като основен скринингов тест и отчитането по него е положително, като втори скринингов тест трябва да се направи теста за изолация, PCR тест или FISH тест. Когато IF тестът е използван като втори скринингов тест и отчитането по него е положително, за завършване на анализа е необходимо допълнително тестване в зависимост от схемата.

Забележка. Използват се валидирани антитела на *R. solanacearum* (виж интернет страница <http://forum.europe.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Препоръчва се за всяка нова партида антитела да се определи титърът. Титър е най-високото разреждане, при което се осъществява оптимална реакция при изпитването на суспензия, съдържаща 105 до 106 клетки на ml от хомоложния щам на *R. solanacearum*, като се използва подходящо конюгат с флуоресцеин изотиоцианат (FITC) в съответствие с указанията на производителя. Всички валидирани поликлонални антисеруми са имали IF титър поне 1:2000. По време на тестването антителата трябва да се използват при работно разреждане/ работни разреждания, близки до или равни на титъра.

Тестването трябва да се извърши с прясно приготвени екстракти от проби. При необходимост то може успешно да се извърши с проби, съхранявани при температура от -68 до -86°C в глицерин. Глицеринът може да се отстрани от пробата чрез добавяне на 1 ml буфер за разреждане на утайката (Допълнение 4), повторно центрофугиране за 15 минути при 7000 g и повторно суспендиране в равно количество буфер за разреждане на утайката. Това не се налага често, особено ако пробите са фиксирани към предметните стъкла на пламък.

Подготвят се отделни предметни стъкла с положителни контроли на хомоложния щам или на друг референтен щам на *R. solanacearum* и суспендирани в картофен екстракт, определен в Допълнение 3Б, и по избор - в буфер.

При възможност трябва да се използва естествено заразена тъкан (запазена чрез лиофилизация или замразяване при температура от -16 до -24°C), като контролата се накапе върху предметните стъкла за IF.

Като отрицателни контроли могат да се използват екстракти от проби, които при предходно тестване са дали отрицателни резултати за *R. solanacearum*.

Стандартизираните положителни и отрицателни контроли, които могат да се използват с този тест, са изброени в Допълнение 3.

Използват се многогнездни предметни микроскопски стъкла, като се предпочитат тези с 10 кладенчета и с диаметър 6 mm за всяко кладенче.

Контролният материал се тества по същия начин както пробата/пробите.

5.1. Приготвяне на предметни стъкла, като се използва една от следните процедури:

а) За утайки със сравнително малко съдържание на скорбяла:

С пипета се отмерва стандартно количество (15 µl е подходящо за кладенче с диаметър 6 mm - в мащаб се изчисляват количествата за по-големите прозорци) с разреждане 1/100 от ресуспендираната картофена утайка върху първия прозорец. След

това се отмерва с пипета сходно количество неразредена пелета (1/1) върху останалите прозорци в реда. Вторият ред може да се използва като дублиращ или за втора проба, както е показано на фиг. 1.

б) За други утайки:

Приготвят се десетични разреждания (1/10, 1/100) на ресуспендираната утайка в буфер за разтваряне на утайката. С пипета се отмерва измерено стандартно количество (15 ml е подходящо за кладенче с диаметър 6 mm - в мащаб се изчисляват количествата за по-големите кладенчета) от ресуспендираната утайка и всяко разреждане върху реда от кладенчета. Вторият ред може да се използва като дублиращ или за втора проба, както е показано на фиг. 2.

5.2. Капките се изсушават на стайна температура или чрез затопляне до температури от 40 до 45°C. Бактериалните клетки се фиксират върху предметното стъкло чрез загряване (15 минути при 60°C) с помощта на пламък, с 95 % етанол или в съответствие с конкретните указания на доставчиците на антителата.

При необходимост фиксираните предметни стъкла могат да се съхраняват в замразено състояние в сухи кутии за необходимото време (не повече от три месеца), преди да бъдат подложени на ново тестване.

5.3. IF процедура

а) В съответствие с метода за приготвяне на стъклата, описан в 5.1а):

Приготвя се серия разреждания от две части. В първото гнездо се поставя 1/2 от титъра (T/2), а в другите - 1/4 от титъра (T/4), 1/2 от титъра (T/2), титъра (T) и два пъти титъра (2T).

б) В съответствие с метода за подготвяне на стъклата за теста, описан в 5.1б):

Приготвя се работното разреждане (WD) на антилялото в IF буфер. Работното разреждане е разреждането на антисерума, позволяващо оптимална специфичност, и обикновено е на половината на титъра.

Фиг. 1. Приготвяне на предметните стъкла за теста в съответствие с 5.1а) и 5.3а)

Разреждане на разтворената утайка

	$\frac{1}{10}$	1/1	1/1	1/1	1/1	<input type="checkbox"/> Разреждане
	0					на разтво-
						рената
						утайка
(T = титър)	T/2	T/4	T/2	T	2T	<input type="checkbox"/> Двойни раз-
						реждания
						на антисе-
						рума/анти-
						тяло

Проба 1	•1	•2	•3	•4	•5
Повтаряне на проба 1 или проба 2	•6	•7	•8	•9	•10

Фиг. 2. Подготовка на предметното стъкло с пробите в съответствие с 5.1б) и 5.3б)

Работно разреждане на антисерум/антитяло
1/1 1/10 1/100 празно празно Десетично
разреждане
на утайката

Проба 1	•1	•2	•3	•4	•5
Повта- ряне на проба 1 или проба 2	•6	•7	•8	•9	•10

5.3.1. Предметните стъкла се подреждат върху влажна хартия. Всяко кладенче се накапва с разреденото антитяло. Във всяко кладенче количеството на антитялото трябва да е най-малко равно на количеството на екстракта.

Когато не са дадени конкретни указания от доставчиците на антителата, се извършва следната процедура:

5.3.2. Предметните стъкла се инкубират на влажна камера в продължение на 30 минути при стайна температура (18 до 25°C).

5.3.3. От всяко предметно стъкло се изтръскват капчиците и внимателно се промива с IF буфер. Измива се чрез потапяне за 5 минути в IF буфер-Твееп (Допълнение 4), а след това в IF буфер. Трябва да се внимава да не се образуват аерозоли или да се разпръснат капчици, което би довело до кръстосано заразяване. Излишната влага се отстранява чрез внимателно попиване.

5.3.4. Предметните стъкла се подреждат върху влажна хартия. Кладенчетата се накапват с разределения FITC конюгат, използвано за определяне на титъра. Във всяко кладенче количеството на конюгата трябва да е най-малко равно на количеството на антитялото.

5.3.5. Предметните стъкла се инкубират във влажна камера в продължение на 30 минути при стайна температура (18 до 25°C).

5.3.6. От всяко предметно стъкло се изтръскват капчиците. Изплаква се и се измива, както е описано по-горе (5.3.3).

Внимателно се отстранява излишната влага.

5.3.7. С пипета върху всяко кладенче се накапват по 5 - 10 µl от 0,1 М фосфатен буфер с глицерин (Допълнение 4) или предпазващо от обезцветяване вещество, продавано в търговската мрежа, и се покриват с покривно стъкло.

5.4. Отчитане на IF тест:

5.4.1. Предметните стъкла се разглеждат под микроскоп, снабден с епифлуоресцентна светлина и с подходящи филтри за работа с FITC, под имерсионно масло при увеличение от 500x до 1000x. Кладенчетата се наблюдават по дължината на два перпендикулярни диаметъра и по периметъра. За пробите, които не показват никакви клетки или малък брой клетки, се наблюдават поне 40 микроскопски полета.

Най-напред се проверява предметното стъкло с положителната контрола. Клетките трябва да се светли, флуоресцентни и напълно оцветени при определения титър за антияло или работно разреждане. Ако оцветяването не е добро, IF тестът (раздел VI.A.5) трябва да се повтори.

5.4.2. Кладенчетата на IF стъклата се наблюдават за светли флуоресциращи клетки с характерната морфология на *R. solanacearum* (виж интернет страница <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Интензитетът на флуоресценцията трябва да е равен на оцветяването на положителната контрола при същото разреждане на антиялото. Клетките с непълно оцветяване или със слаба флуоресценция не се зачитат.

При съмнение за зараза тестът трябва да се повтори. Това става, когато всички предметни стъкла в партидата показват положителни клетки поради заразяване на буфера или ако се открият положителни клетки (извън прозорците на предметните стъкла) върху покритието на предметните стъкла.

5.4.3. Няколко проблема са присъщи за спецификата на имунофлуоресцентния тест. В утайките от картофените "очи" и сегменти от стъблото могат да се появят популации от флуоресциращи клетки с атипична морфология и клетки на сапрофитни бактерии с кръстосано действие, чиито размер и морфология са сходни до тези на *R. solanacearum*.

5.4.4. Разглеждат се само флуоресциращите клетки с типичен размер и морфология при титъра или работното разреждане на антителата в 5.3.

5.4.5. Интерпретиране на IF теста:

а) При откриване на светли флуоресциращи клетки с характерна морфология се определя средният брой на типични клетки за микроскопско поле и се изчислява броят на типичните клетки за ml разтворена утайка (Допълнение 5).

Отчетените резултати от IF тест са положителни за пробите с поне 5 x 10³ типични клетки за ml разтворена утайка. Пробата се определя като потенциално заразена и бъдещите тестове продължават.

б) IF тест е отрицателен за всяка проба с по-малко от 5 x 10³ типични клетки за ml разтворена утайка и пробата се счита за отрицателна. Не се налага допълнително тестване.

6. PCR тестове

Принципи

Когато PCR тест се използва като основен скринингов тест и резултатите от него са положителни, трябва да се направи изолация или IF тест като втори задължителен скринингов тест. Когато PCR тестът се използва като втори скринингов тест и резултатите от него са положителни, трябва да се направи допълнително тестване в съответствие със схемата, за да завърши диагностицирането.

Пълното използване на този метод като основен скринингов тест се препоръчва само когато са натрупани необходимите експертни знания и умения.

Забележка. Предварителното изпитване с помощта на този метод трябва да позволява възпроизводимо установяване на 10³ до 10⁴ клетки на *R. solanacearum* на ml в екстракти от проби, които са дали отрицателни резултати при предишно изпитване. За да се постигнат максимални нива на чувствителност и конкретност във всички лаборатории, може да се наложи експериментиране с цел оптимизиране на изпитването.

Използват се валидирани PCR реагенти и протоколи (виж Допълнение 6). По-

добре е да се избере метод с вътрешна контрола.

Използват се подходящи предпазни мерки, за да се избегне заразяване на пробите с ДНК. За да се минимизира възможността за заразяване с ДНК, PCR тестът трябва да се провежда от опитни технически лица в специализирани лаборатории по молекулярна биология.

Отрицателните контроли (за екстракция на ДНК и за PCR процедури) винаги трябва да се обработват като окончателни проби в процедурата, за да стане ясно дали е настъпило пренасяне на ДНК.

В PCR теста трябва да се включат следните контроли:

- Екстракт от проба, която е дала отрицателен резултат за *R. solanacearum* при предишно изпитване.

- Буферни контроли, използвани за екстракция на бактерията и ДНК от пробата.

- Микс за PCR реакция.

Включват се задължително следните положителни контроли:

- Количества от разтворени утайки, към които е добавена *R. solanacearum* (изготвяне виж в Допълнение 3Б).

- Суспензия от 10⁶ клетки на ml *R. solanacearum* във вода от вирулентен щам (например NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; виж Допълнение 3Б).

- При възможност се използва също ДНК, екстрахирана от положителни контролни проби в PCR теста.

За да се избегне потенциално заразяване, положителните контроли се приготвят отделно от пробите за тестване.

Екстрактите от проби трябва по възможност да не са замърсени с почва. Затова в някои случаи се препоръчва да се приготвят екстракти от измити картофи, когато ще се използват PCR протоколи.

Стандартизираните положителни и отрицателни контролни материали, които могат да се използват в този тест, са изброени в Допълнение 3.

6.1. Методи за пречистване на ДНК.

Използват се описаните по-горе положителни и отрицателни контролни проби (виж Допълнение 3).

Контролите се изпитват по същия начин както пробата/пробите.

Съществуват голям брой методи за пречистване на ДНК от сложни пробни субстрати, като се отстраняват инхибиторите на PCR и други ензимни реакции и се концентрира ДНК в екстракта от пробата. Следващият метод е оптимизиран за използване на валидираните PCR методи, дадени в Допълнение 6.

(a) Метод на Pastrok (2000)

1) Отмерва се с пипета 220 µl буфер за лизиране (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) в епендорфова епруетка от 1,5 ml.

2) Прибавя се 100 µl екстракт от пробата и се поставя в подгряващ блок или водна баня при 95°C за 10 минути.

3) Епруетката се поставя в лед за 5 минути.

4) Прибавя се 80 µl Lysozyme стокков разтвор (50 mg Lysozyme на ml в 10 mM Tris HCl, pH 8,0) и се инкубира при 37°C за 30 минути.

5) Прибавя се 220 µl Easy DNAT разтвор A (Invitrogen), разбърква се добре на Vortex и се инкубира при 65°C за 30 минути.

6) Прибавя се 100 µl Easy DNAT разтвор B (Invitrogen), разбърква се силно, докато преципитатът започне да се движи свободно в епруетката и пробата става

еднородна.

7) Прибавя се 500 µl хлороформ и се разбърква до намаляване на вискозитета и сместа стане хомогенна.

8) Центрофугира се при 15 000 g за 20 минути при 4°C за отделяне на фазите и създаване на фазова граница.

9) Горната фаза се прехвърля в чиста епендорфова епруветка.

10) Прибавя се 1 ml 100 % етанол (-20°C), разбърква се бързо и се инкубира в лед за 10 минути.

11) Центрофугира се при 15 000 g за 20 минути при 4°C и се отстранява етанолът от утайката.

12) Прибавя се 500 µl 80 % етанол (-20°C) и се разбърква чрез обръщане на епруветката.

13) Центрофугира се при 15 000 g за 10 минути при 4°C, оставя се утайката и се отстранява етанолът.

14) Утайката се оставя да изсъхне на въздух или в DNA speed vac.

15) Разтваря се отново утайката в 100 µl стерилна ултрачиста вода и се оставя на стайна температура най-малко за 20 минути.

16) Съхранява се при -20°C, докато потръбва за PCR.

17) Утаява се белият преципитат чрез центрофугиране и се използват 5 µl от надутайката, съдържаща ДНК за PCR.

б) Други методи

Могат да се използват и други методи за екстракция на ДНК, например Qiagen DNeasy Plant Kit, при условие че са доказали, че са еднакво ефективни при пречистване на ДНК от контролни проби, съдържащи 103 до 104 клетки на патогена за ml.

6.2. PCR

6.2.1. Приготвят се тестови и контролни матрици за PCR в съответствие с валидираните протоколи (раздел VI.A.6). Приготвя се едно десетократно разреждане на екстракта на пробата ДНК (1:10 в ултрачиста вода).

6.2.2. Приготвя се подходящ PCR микс в съответствие с публикуваните протоколи (Приложение б). При възможност се препоръчва де се използва съставен PCR протокол, който включва и вътрешна PCR контрола.

6.2.3. Прибавя се 2 - 5 µl ДНК екстракт за 25 µl PCR реакция в стерилни PCR епруветки в съответствие с PCR протоколите (виж Допълнение б).

6.2.4. Включете отрицателна контролна проба, съдържаща само микс за PCR реакция, и добавете същия източник в ултрачиста вода, който е използван в PCR микса вместо пробата.

6.2.5. Епруветките се поставят в термоцикълор и се изпълнява подходящо оптимизирана PCR програма (Допълнение б).

6.3. Анализ на продукта от PCR реакцията

6.3.1. PCR фрагментите се разделят чрез агарозна гел електрофореза. Пуска се поне 12 µl амплифициран микс за ДНК реакция от всяка проба, смесена с 3 µl пълнителен буфер (Допълнение б) в 2,0 % (w/v) агарозни гелове в tris-acetate-EDTA (ТАЕ) буфер (Допълнение б) при 5 до 8 V за cm. Използва се подходящ ДНК маркер, например през 100 базови двойки (набор от ДНК фрагменти с фиксирана дължина).

6.3.2. Разкриват се ДНК веригите чрез оцветяване в етидиев бромид (0,5 mg на L) за 30 до 60 минути, като се вземат необходимите предпазни мерки за работа с този мутаген. Необходимо е да се използват специални нитрилни ръкавици за еднократна

употреба.

6.3.3. Оцветеният гел се визуализира при късовълнова UV трансилюминация ($\lambda = 302 \text{ nm}$) за увеличени PCR фрагменти с очаквания размер (Допълнение 6) и се документира с фотоустройство.

6.3.4. За всички нови случаи се прави верифициране на автентичността на PCR фрагмента чрез извършване на ограничителен ензимен анализ върху проба от останалата увеличена ДНК, като се инкубира при оптимална температура и време с подходящ ензим и буфер (виж Допълнение 6). Стабилизираните фрагменти се отделят чрез агарозна гел електрофореза както по-горе и се следи за поява на характерно рестрикционно фрагментиране при UV трансилюминация след оцветяване с етидиев бромид и се сравнява с нестабилизираната и стабилизираната положителна контрола.

Интерпретиране на резултатите от PCR тест:

PCR тестът е отрицателен, ако в пробата не е установен характерен за *R. solanacearum* специфичен фрагмент с очакван размер, но е установен за всички положителни контроли (в случай на съставна PCR със специфични за растението вътрешни контролни праймери: втори PCR фрагмент с очакван размер трябва да се амплифицира с въпросната проба).

PCR тестът е положителен, ако е установен характерен за *R. solanacearum* фрагмент с очакван размер и ако анализът на ензима на свиване на увеличения фрагмент е идентичен на този на контролния положителен щам. Надеждно потвърждаване на положителен резултат може също да се получи, като се повтори тестът с втори набор от PCR праймери (Допълнение 6).

Забележка. Може да има съмнение за инхибиране на PCR, ако очакваният фрагмент е получен от положителната контрола, съдържаща *R. solanacearum* във вода, но отрицателните резултати се получават от положителните контроли с *R. solanacearum* в картофен екстракт. В съставните PCR протоколи с вътрешни PCR контроли инхибиране на реакцията се отбелязва, когато не е получен нито един от двата фрагмента.

Може да има съмнение за заразяване, ако очакваният фрагмент е получен от една или няколко отрицателни контроли.

7. FISH тест

Принцип

Когато FISH тест се използва като първи скринингов тест и резултатите от него са положителни, трябва да се направи изолация или IF тест като втори задължителен скринингов тест. Когато FISH тестът се използва като втори скринингов тест и резултатите от него са положителни, трябва да се направи допълнително тестване в съответствие със схемата, за да завърши диагностиката.

Забележка. Използват се валидирани специфични за *R. solanacearum* олигопраймери (виж Приложение 7). Предварителното тестване с помощта на този метод трябва да позволява възпроизводимо откриване на 103 до 104 клетки на *R. solanacearum* на ml, добавени към екстракти от проби, които са дали отрицателни резултати при предишно изпитване.

Следващата процедура се препоръчва да се извърши с прясно приготвен растителен екстракт, но може успешно да се извърши с екстракт от проби, съхраняван в глицерин при температура от -16 до -24 или от -68 до -86°C.

Като отрицателни контроли се използват екстрактите от проби, които са дали

отрицателни резултати за *R. solanacearum* при предишни тествания.

За положителни контроли се приготвят суспензии, съдържащи 105 до 106 клетки на ml *R. solanacearum* биовар 2 (например щам NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBR 3857, виж Допълнение 3) в 0,01M фосфатен буфер (PB) от 3 до 5-дневна култура). Отделно се приготвят предметни стъкла с положителни контроли от познат щам или друг референтен щам на *R. solanacearum*, поставени в картофен екстракт, определени в Приложение 3Б.

Използването на FITC еубактериален олиго-праймер предлага контрола за процеса на хибридизация, тъй като тя ще оцвети всички еубактерии, които се намират в пробата.

Стандартизираните положителни и отрицателни контролни материали, които могат да се използват с този тест, са изброени в Допълнение 3А.

Контролният материал се тества по същия начин както и пробата/пробите.

7.1. Фиксиране на картофен екстракт

Следващият протокол е на базата на Wullings et al. (1998):

7.1.1. Приготвя се фиксиращ разтвор (виж Допълнение 7).

7.1.2. Отмерва се с пипета 100 µl от всеки екстракт в епендорф епруветка и се центрофугира за 7 минути при 7000 g.

7.1.3. Отстранява се надутайката (супернатанта) и утайката се разтваря в 200 µl от фиксиращия разтвор, приготвен < 24 часа предварително. Разбърква се и се инкубира за един час в хладилник.

7.1.4. Центрофугира се за 7 минути при 7000 g, отстранява се надутайката и утайката се разтваря в 75 µl 0,01 M PB (виж Допълнение 7).

7.1.5. Накапват се по 16 µl от фиксиращата суспензия върху чисто многогнездно предметно стъкло, както е показано на фиг. 7.1. На всяко стъкло се слагат по две различни проби, неразредени, и се използват 10 µl за разреждане 1:100 (в 0,01 M PB). Останалият разтвор от пробата (49 µl) може да се съхрани при -20°C след добавяне на 1 обем 96 % етанол. Ако е необходимо да се повтори FISH тестът, етанолът се отстранява чрез центрофугиране и се добавя равен обем 0,01 PB (размесен чрез разбъркване).

Фиг. 7.1. Схема на разположение на предметно стъкло за FISH тест

Проба 1	Празно	Празно	Празно	Проба 2
0	0	0	0	0
1	2	3	4	5
Проба 1	Празно	Празно	Празно	Проба 2
0	0	0	0	0
6	7	8	9	10

Покривно стъкло 1

Покривно стъкло 2

7.1.6. Предметните стъкла се изсушават на въздух (или в сушилня при 37°C) и се фиксират на пламък.

На този етап процедурата може да се прекъсне и да се продължи с хибридизацията на другия ден. Предметните стъкла се съхраняват обезпрашени и сухи на стайна температура.

7.2. Хибридизация

7.2.1. Клетките се дехидрират, като всяко предметно стъкло се поставя за 1 минута в етанолова серия с нарастващ процент - 50 %, 80 % и 96 %. Предметните стъкла се изсушават на въздух, поставени в държател.

7.2.2. Приготвя се влажна камера за инкубация, като дъното на херметизирана кутия се покрива със салфетка или филтърна хартия, напоена с 1x hybmix (Допълнение7). Кутията се преинкубира в хибридизационна пещ при 45°C за не повече от 10 минути.

7.2.3. Разпределят се по 10 µl от хибридизационния разтвор (Допълнение 7) в 8 прозореца (прозорци 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 и 10; виж фиг. 7.1) върху всяко предметно стъкло, като двата централни прозореца (3 и 8) се оставят празни.

7.2.4. Върху първите и последните четири прозореца се поставят покривни стъкла (24 x 24 mm), без да се отстранява въздухът. Предметните стъкла се поставят в предварително затоплената влажна камера и се хибридизират за пет часа в пещта при 45°C на тъмно.

7.2.5. Приготвят се три химични чаши, съдържащи 1 L Milli Q (молекулярно качество) вода, 1 L 1x hybmix (334 ml 3x hybmix и 666 ml Milli Q вода) и 1 L 1/8x hybmix (42 ml 3x hybmix и 958 ml Milli Q вода). Всяка чаша предварително се инкубира на водна баня при 45°C.

7.2.6. Отстраняват се покривните стъкла от предметните стъкла и последните се поставят в държател.

7.2.7. Отмива се излишъкът от пробата чрез инкубиране за 15 минути в химичната чаша с 1x hybmix при 45°C.

7.2.8. Държателят се поставя в 1/8x hybmix миеш разтвор и се инкубира за още 15 минути.

7.2.9. Предметните стъкла се потапят за кратко време в Milli Q вода и се поставят върху филтърна хартия. Отстранява се излишната вода чрез внимателно покриване на повърхността с филтърна хартия. Отмерва се с пипета 5 до 10 ml предпазващ от обезцветяване клей (например Vectashield, Vecta Laboratories, Калифорния, САЩ, или равностоен) и върху цялото предметно стъкло се поставя голямо покривно стъкло (24 x 60 mm).

7.3. Отчитане на резултатите от FISH теста

7.3.1. Предметните стъкла се наблюдават под микроскоп, пригоден за епифлуоресцентна микроскопия с увеличение от 630x или 1000x, с имерсионно масло. С филтър, подходящ за флуоресцентен изотиоцианат (FITC), еубактериалните клетки (включително и повечето грам-отрицателни клетки) в пробата се оцветяват във флуоресцентно зелено. При използването на филтър за тетраметилпродамин-5-изотиоцианат Cy3 - клетките на *R. solanacearum* се оцветяват във флуоресциращо червено. Сравнява се морфологията на клетките с тази на положителните контроли. Клетките трябва да са светли, флуоресциращи и напълно оцветени. Ако оцветяването е нетипично, FISH тестът (раздел VI.A.7) трябва да се повтори. Кладенчетата на стъклата се наблюдават по дължината на два перпендикулярни диаметъра и по периметъра. За пробите, които не показват никакви клетки или малък брой клетки, се наблюдават поне 40 микроскопски полета.

7.3.2. Кладенчетата се наблюдават за светли, флуоресциращи клетки с характерната морфология на *R. solanacearum* (виж интернет страница <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Интензитетът на флуоресценцията

трябва да е равен или по-силен от този на положителната контрола. Клетките с непълно оцветяване или със слаба флуоресценция не се зачитат.

7.3.3. При съмнение за заразяване тестът трябва да се повтори. Това става, когато всички предметни стъкла в партидата показват положителни клетки, поради заразяване на буфера или ако се открият положителни клетки (извън кладенчетата на предметните стъкла) върху покритието на предметните стъкла.

7.3.4. Няколко проблема са присъщи за спецификата на FISH теста. В екстрактите от картофени конуси и растителни части от стъблата могат да се появят фонові популации от флуоресциращи клетки с атипична морфология и сапрофитни бактерии с кръстосано действие, чиито размер и морфология са сходни до тези на *R. solanacearum*.

7.3.5. Разглеждат се само флуоресциращите клетки с типичен размер и морфология.

7.3.6. Интерпретиране на резултата от FISH теста:

а) Валидни резултати от FISH теста се получават, когато се наблюдават яркозелени флуоресциращи клетки с размер и морфология, типични за *R. solanacearum*, когато се използва FITC филтър, и яркочервени флуоресциращи клетки, когато се използва родаминов филтър, във всички положителни контроли и нито в една отрицателна контрола. При откриване на светли флуоресциращи клетки с характерна морфология се определя средният брой на типични клетки за микроскопско поле и се изчислява броят на типичните клетки за ml разтворена утайка (Допълнение 4). Пробите с поне 5×10^3 типични клетки за ml разтворена утайка се считат за потенциално заразени. Налага се допълнително изпитване. Пробите с по-малко от 5×10^3 типични клетки за ml разтворена утайка се считат за отрицателни.

б) FISH тестът е отрицателен, когато не се наблюдават яркочервени флуоресциращи клетки с размер и морфология, типични за *R. solanacearum*, когато се използва родаминов филтър при условие, че се наблюдават типични яркочервени флуоресциращи клетки в положителните контроли, когато се използва родаминов филтър.

8. ELISA тестове

Принцип

Поради сравнително ниската чувствителност на ELISA теста той може да се използва само като допълнителен тест към IF, PCR и FISH. Когато се използва DAS ELISA задължително се прави обогатяване и се използват моноклонални антитела (виж интернет страница <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Обогатяването на пробите, преди да се използва ELISA, може да е полезно като начин за увеличаване на чувствителността на теста, но може да се провали поради конкуриране от страна на други организми в пробата.

Забележка. Използва се утвърден източник на антитела на *R. solanacearum* (виж интернет страница <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Препоръчва се за всяка нова партида антитела да се определи титърът. Титър е най-високото разреждане, при което се осъществява оптимална реакция при тестването на суспензия, съдържаща 105 до 106 клетки на ml от хомоложния щам на *R. solanacearum*, като се използват подходящи конюгатни съединения на вторични антитела в съответствие с указанията на производителя. По време на тестването антителата трябва да се използват при работно разреждане, близко до или равно на титъра на търговската рецептура.

Определя се титърът на антителата върху бактериална суспензия, съдържаща 105 до 106 клетки на ml от хомоложния щам на *R. solanacearum*.

Включва се екстракт от проби, които са дали отрицателен резултат за *R. solanacearum* при предишно изпитване, и суспензия на бактерия без кръстосано действие във фосфатен физиологичен буфер (PBS) като отрицателни контроли.

Като положителни контроли се използват аликвоти от екстракт от проби, които при предходно изпитване са дали отрицателни резултати, смесени с 103 до 104 клетки на ml щам на *R. solanacearum* биовар 2 (например щам NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBR 3857, виж Допълнение 2А и Б). За сравняване на резултатите във всяка петри се използва стандартна суспензия, съдържаща 105 до 106 клетки на ml в PBS на *R. solanacearum*. Осигурява се отделяне на положителните контроли от пробата/те за тестване.

Стандартизираните положителни и отрицателни контролни, които могат да се използват за този тест, са изброени в Допълнение 3А.

Контролният материал се тества по същия начин като пробата/те.

Валидирани са два ELISA протоколи:

(а) Индиректна ELISA (Robinson Smith et al., 1995)

1) Използват се 100 до 200 μ l количества от екстракт на пробата. (Загриването при 100°C за четири минути във водна баня или загряващ блок може да намали неспецифичните резултати в някои случаи).

2) Прибавя се равен обем coating буфер (Допълнение 4) и се разбърква на Vortex.

3) Поставят се по 100 μ l най-малко в две гнезда на многоканална плака (например Nunc-Polysorp или подобни) и се инкубира за един час при 37°C или за едно денонощие при 4°C.

4) След инкубация концентрираният екстракт се отстранява от плаката, като гнездата се промиват трикратно с PBS-Tween (Допълнение 4). При последното промиване миещият разтвор се оставя в гнездата най-малко пет минути.

5) Приготвя се подходящо разреждане на антитела за *R. solanacearum* в блокиращ буфер (Допълнение 4). За валидираните комерсиални антитела се използват препоръчаните от фирмата разреждания (обикновено два пъти по-концентрирани от титъра).

6) Поставят се по 100 μ l от разредения антисерум във всяко гнездо и се инкубира за един час при 37°C.

7) Отстранява се антисерумът от гнездата на плаката и се измива, както е описано в т. 4).

8) Приготвя се подходящо разреждане на вторичното антитяло на алкално-фосфатазен конюгат в блокиращ буфер. Поставят се по 100 μ l във всяко гнездо на плаката и се инкубира за един час при 37°C.

9) Отстранява се конюгатът от плаката и се измива, както е описано в т. 4).

10) Прибавя се по 100 μ l разтвор на субстрат на алкална фосфатаза (Допълнение 4) във всяко гнездо. Инкубира се на тъмно при стайна температура и се отчита абсорбция при 405 nm на равни интервали в рамките на 90 минути.

(б) DAS ELISA

1) Приготвя се подходящо разреждане на поликлонален антисерум за *R. solanacearum* в coating буфер с pH 9,6 (Допълнение 4). Поставят се по 200 μ l във всяко гнездо. Плаката се инкубира при 37°C за четири до пет часа или при 4°C - за 16 часа.

2) Гнездата се измиват трикратно с PBS-Tween (Допълнение 4).

Поставят се по 190 µl екстракт от пробата в най-малко две от гнездата. Поставят се положителни и отрицателни контроли - всяка в по две гнезда за всяка плака. Инкубира се за 16 часа при 4°C.

3) Гнездата се измиват трикратно с PBS-Tween (Допълнение 4).

4) Приготвя се подходящо разреждане на специфични за *R. solanacearum* моноклонални антитела в PBS (Допълнение 4), съдържащи 0,5 % bovine serum albumin (BSA), и се поставят по 190 µl във всяко гнездо. Инкубира се при 37°C за два часа.

5) Гнездата се измиват трикратно с PBS-Tween (Допълнение 4).

6) Приготвя се подходящо разреждане на антимиши имуноглобулин конюгат с алкална фосфатаза в PBS. Поставя се по 190 µl във всяко гнездо. Инкубира се при 37°C за два часа.

7) Гнездата се измиват трикратно с PBS-Tween (Допълнение 4).

8) Приготвя се разтвор на алкално фосфатазен субстрат, съдържащ 1 mg p-nitrophenyl phosphat за ml субстратен буфер (Допълнение 4). Поставят се по 200 µl за всяко гнездо. Инкубира се на тъмно при стайна температура и се отчита абсорбция при 40 nm на равни интервали в рамките на 90 минути.

Интерпретиране на резултатите от ELISA тест:

ELISA тестът е отрицателен, ако средната оптична плътност (OD) на пробата е по-ниска ($< 2x$ OD) от удвоената плътност на отрицателната контролна проба при условие, че всички оптични плътности на положителните контроли са над 1,0 (след 90 минути инкубация със субстрата) и са по-големи от два пъти OD, получена за екстрактите на отрицателните проби.

ELISA тестът е положителен, ако оптическата плътност (OD) на пробата е по-висока ($> 2x$ OD) от удвоената плътност на отрицателната контролна проба при условие, че средната оптична плътност във всички отрицателни контролни гнезда е $< 2x$ от отчитанията в положителните контролни гнезда.

Отрицателни отчитания от ELISA теста в гнездата с положителната контролна означава, че тестът не е проведен правилно или е бил инхибиран. Положителни отчитания от ELISA теста в гнездата с отрицателната контрола означава, че е настъпило кръстосано заразяване или неспецифично свързване на антитела.

9. Провеждане на биологичен тест

Забележка. Предварителното тестване с този метод трябва да дава възможност за установяване на 103 до 104 клетки на *R. solanacearum* на ml, прибавени към екстракти от проби, които са дали отрицателен резултат при предишно тестване (за подготовка виж Допълнение 3).

Най-висока чувствителност на откриване чрез този метод може да се очаква, когато се използват пряно приготвени екстракти от проби и оптимални условия за растеж. Методът може да се прилага успешно и за екстракти, които са били съхранявани в глицерин при температура от -68 до -86°C.

Протоколът по-долу е на базата на Janse (1988):

9.1. Използват се 10 тествания за всяка проба от чувствителни сортове домати (например "Money-maker" или сорт със сходна чувствителност, определена от изпитващата лаборатория) във фаза на развитие трети същински лист. За подробна информация по отношение на културите виж Допълнение 8. Могат да се използват и патладжани (например сорт "Black Beauty" или сортове със сходна чувствителност),

като се използват растения във фаза втори или трети същински лист. Симптомите се проявяват по-слабо и се развиват по-бавно при патладжана. Затова се препоръчва при възможност да се използва доматен разсад.

9.2. Разпределят се по 100 μ l концентриран екстракт от проби между отделните тествастения.

9.2.1. Инокулация със спринцовка:

Инокулират се стъблата на растенията в участъка над котиледоните и под първи същински лист, като се използва спринцовка за инсулин с хиподермична игла (най-малко 23G). Екстрактът от пробата се разпределя между тествастенията.

9.2.2. Инокулация чрез разрез:

Растението се задържа с два пръста, с пипета се отмерва капка (приблизително 5 - 10 μ l) от разредената утайка и се капва върху стъблото между котиледоните и първи същински лист.

С помощта на стерилен скалпел се прави диагонален разрез с дължина около 1,0 cm, на дълбочина приблизително 2/3 от дебелината на стъблото, като се започва от капката.

Разрезът се запечатва със стерилен вазелин с помощта на спринцовка.

9.3. С помощта на същата техника се инокулират пет растения с водна суспензия, съдържаща 105 до 106 клетки на ml, биовар 2 щам на *R. solanacearum*, приготвена от 48-часова чиста култура, като положителна контрола и с буфер за разтваряне на утайката (Допълнение 4), като отрицателна контрола. Положителните и отрицателните контролни растения се отделят от другите растения, за да се избегне кръстосано заразяване.

9.4. Тествастенията се отглеждат при карантинни условия за период до четири седмици при температура от 25 до 30°C и висока относителна влажност с подходящо напояване, за да се избегне прекомерното поливане или увяхване поради недостиг на вода. За да се избегне заразяването на тествастенията, инкубирането на растенията за положителна и отрицателна контрола става на отделни стендове в оранжерия или камера за нарастване или ако пространството е ограничено, се осигурява стриктно разделяне при отглеждане. Ако растения, предназначени за различни проби, трябва да се инкубират близо едни до други, те се отделят с подходящи екрани. При торене, напояване, инспектиране и други манипулации се полагат специални грижи, за да не се допусне кръстосано заразяване. От съществено значение е в оранжерии и камерите за нарастване да не се допуснат никакви вредни насекоми, тъй като те могат да пренесат бактерията от една проба на друга.

Растенията се наблюдават за симптоми на увяхване, епинастия, хлороза и/или закръняване.

9.5. Инфектираните растения се изолират (раздел II.3) и се идентифицират културите без предполагаемо заразяване с *R. solanacearum* (раздел VI.Б).

9.6. Ако след три седмици не се наблюдават никакви симптоми, се извършват IF тест, PCR тест или изолация на съставна проба от стъблени части с дължина 1 cm, взети над мястото на инокулация от всички тествастения. Ако тестът е положителен, се прави посявка с разреждане в петри (раздел 4.1).

9.7. Идентифицират се предполагаемите за вероятно заразени култури с *R. solanacearum* (раздел VI.Б).

Интерпретиране на резултатите от биологичния тест:

Реални резултати от биологичния тест се получават, когато растенията от

положителната контрола показват типични симптоми и от тези растения може повторно да се реизолира бактерията и по отрицателните контролни растения не са установени никакви симптоми.

Биологичният тест е отрицателен, когато тестрастения не са заразени с *R. solanacearum* и ако инокулираните положителни контролни растения са заразени с *R. solanacearum*.

Биологичният тест е положителен, когато тест растения са заразени с *R. solanacearum*.

Б. Идентификационни тестове

Идентифицират се чисти култури на предполагаеми изолати на *R. solanacearum*, като се използват най-малко два от дадените по-долу тестове на основата на различни биологични принципи.

За всеки извършен тест се включват познати референтни щамове за положителна контрола в зависимост от случая (виж Допълнение 3).

1. Хранителни и ензимни тестове за идентификация

Определят се следните фенотипни характеристики на *R. solanacearum*, които присъстват или отсъстват, в съответствие с методите на Lelliott и Stead (1987), Klement et al. (1990), Schaad (2001).

Тест	Очакван резултат
Производство на флуоресцентен пигмент	-
Поли-бета-хидроксibuтиратни гранули (РНВ)	+
Оксидазо-ферментативен тест (О/Ф)	О+/F-
Каталазна активност	+
Оксидазен тест на Ковач	+
Редукция на нитратите	+
Усвояване на цитрат	+
Растеж при 40°C	-
Растеж в 1 % NaCl	+
Растеж в 2 % NaCl	-
Аргинин дехидролазна активност	-
Втечняване на желатина	-
Хидролиза на скорбяла	-
Хидролиза на ескулина	-
Производство на Леван	-

2. IF тест

2.1. Приготвя се суспензия с приблизително 10⁶ клетки на ml от културата в IF буфер (Допълнение 4).

2.2. Приготвя се серия с двойно разреждане на подходящ антисерум (виж интернет страница <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

2.3. Прилага се IF процедура (раздел VI.A.5).

2.4. IF тест е положителен, ако IF титърът на културата е еквивалентен на IF титъра на положителната контрола.

3. ELISA тест

Забележка. Ако се изпълняват само 2 теста за идентификация, не се използва друг серологичен тест в допълнение на този метод.

3.1. Приготвя се суспензия с приблизително 108 клетки на ml от бактериалната култура в 1x PBS (Допълнение 4).

3.2. Прилага се подходяща ELISA процедура със специфично за *R. solanacearum* моноклонално антитяло.

3.3. ELISA тестът е положителен, когато отчетените стойности за културата са не по-малки от половината на тези, получени от положителната контрола.

4. PCR тестове

4.1. Приготвя се суспензия с приблизително 106 клетки на ml от културата в стерилна вода.

4.2. Загриват се 100 µl от бактериалната суспензия в затворени епруветки на подгриващ блок или на вряща водна баня при 100°C за четири минути. След това пробите може да се съхраняват при -16 до -24°C, колкото е необходимо.

4.3. Прилагат се подходящи PCR процедури за амплификация на специфичните за *R. solanacearum* фрагменти (например Seal et al. (1993); Pastrik и Maiss (2000); Pastrik et al. (2002); Boudazin et al. (1999); Opina et al. (1997), Weller et al. (1999).

4.4. Постигнат е положителен резултат за *R. solanacearum*, ако PCR фрагментите на културата имат същия размер и имат същите полиморфизми по дължината на рестрикционните фрагменти като на положителния контролен щам.

5. FISH тест

5.1. Приготвя се суспензия с приблизително 106 клетки на ml в ултрачиста вода.

5.2. Прилага се FISH процедура (раздел VI.A.7) с най-малко две специфични за *R. solanacearum* олигопраймери (Допълнение 7).

5.3. FISH тестът е положителен, когато културата дава реакция, идентична на тази на положителната контрола.

6. Профил на мастните киселини (FAP)

6.1. Културата се отглежда върху trypticase soy agar (Oxoid) за 48 часа при 28°C.

6.2. Прилага се подходяща FAP процедура (Janse, 1991; Stead, 1992).

6.3. FAP тестът е положителен, когато профилът на предполагаемата култура е идентичен с този на положителната контрола. Характерните мастни киселини са следните 14:0 ЗОН, 16:0 ЗОН, 16:1 ЗОН и 18:1 ЗОН, а отсъствие на 16:0 ЗОН в голяма степен е показателно за *Ralstonia* sp.

7. Методи за характеризирание на щама

Препоръчва се един от следните методи за характеризирание на щама за всеки нов случай на изолиране на *R. solanacearum*.

За всеки направен тест се включват познати референтни щамове (виж Допълнение 3).

7.1. Определяне на биовара

R. solanacearum е разделена на биовари въз основа на способността за утилизация и/или окисляване на три дизахариди и три хексоза алкохоли (Hayward, 1964,

и Hayward et al., 1990). В Приложение 2 е дадено описание на хранителните среди за тестване на биовара. Тестът може да се извърши успешно, като средите се инокулират чрез пробождане с чисти култури на изолати на *R. solanacearum* и се инкубират при 28°C. Ако средите се разпределят в стерилни плаки с 96 гнезда (200 µl за гнездо), може да се наблюдава промяна в цвета от маслинозелено в жълто в рамките на 72 часа, което означава положителен резултат от теста.

	Биовар				
	1	2	3	4	5
Усвояване на:					
Малтоза	-	+	+	-	+
Лактоза	-	+	+	-	+
D (+) Целобиоза	-	+	+	-	+
Манитол	-	-	+	+	+
Сорбитол	-	-	+	+	-
Дулцитол	-	-	+	+	-

Допълнителните тестове позволяват разграничаването на биовар 2 в подфенотипове

	Биовар 2А (световно разпростра- нение)	Биовар 2А (разпрост- ранен в Чили и Колумбия)	Биовар 2Т (разпрост- ранен в тропич- ните зони)
Усвояване на трехалоза	-	+	+
Усвояване на мезо-инозитол	+	-	+
Усвояване на D рибоза	-	-	+
Пектолитична активност (1)	ниска	ниска	висока
(1) Виж Lelliott и Stead (1987)			

7.2. Геномен отпечатък:

Следните процедури позволяват да бъде извършено молекулно диференциране на щамовете в комплекса на *R. solanacearum*:

7.2.1. Анализ на полиморфизма по дължината на рестриционните фрагменти (RELП) (Cook et al., 1989).

7.2.2. PCR с повтаряща се последователност, използваща REP, BOX и ERIC праймери (Louws et al., 1995; Smith et al., 1995).

7.2.3. Анализ на полиморфизмите по дължината на амплифицираните фрагменти (AFLP) (Van der Wolf et al., 1998).

7.3. PCR методи

Специфичните PCR праймери могат да се използват за диференциране на шамове от раса 1 (биовари 3, 4 и 5) и раса 2 (биовари 1, 2А и 2Т) на *R. solanacearum*, първоначално определени чрез RFLP анализ (Cook et al., 1989) и секвениране на 16S рДНК (Taghavi et al., 1996).

В. Тест за потвърждаване

Тестът за патогенност трябва да се направи като окончателно потвърждаване на диагностициране на *R. solanacearum* и за потвърждаване на вирулентността на идентични култури, идентифицирани като *R. solanacearum*.

1) Приготвя се инокулум с приблизително 10⁶ клетки на ml от 24- до 48-часова култура на изолата за тестване и подходящ положителен контролен шам на *R. solanacearum* (например NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBR 3857; виж Допълнение 3).

2) Инокулират се 5 до 10 доматени растения или растения патладжан във фаза трети същински лист (виж раздел VI.A.9).

3) Инкубират се за не повече от две седмици при температура 25 до 28°C и висока относителна влажност с подходящо напояване, за да се избегне прекомерното поливане или стрес от засушаване. При чистите култури типичното увяхване трябва да се получи в рамките на 14 дни. Ако след този период не са налице симптоми, не може да се потвърди, че културата е патогенна форма на *R. solanacearum*.

4) Растенията се наблюдават за симптоми на увяхване и/или епинастия, хлороза.

5) От растенията със симптоми се взема част от стъблото на около 2 cm над точката на инокулация. Стрива се в малко количество стерилна дестилирана вода или 50 mM фосфатен буфер (Допълнение 4). Прави се посевка от суспензията върху подходяща среда, за предпочитане селективна среда (Допълнение 2), петритата се инкубират за 48 до 72 часа при 28°C и се наблюдава за появата на колонии, типични за *R. solanacearum*.

Допълнение 1

Лаборатории, които участват в оптимизирането и валидирането на протоколите

Лаборатория (1)	Място	Страна
1	2	3
Agentur fur Gesundheit und Ernährungssicherheit	Vienna, Linz	Австрия
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Белгия
Plantedirektoratet	Lyngby	Дания
Central Science Laboratory	York	Англия
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburgh	Шотландия
Laboratoire National de la Protection des Vegetaux, Unite de Bacteriologie	Angers	Франция
Laboratoire National de la Protection des Vegetaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Франция

Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Германия
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Германия
State Laboratory	Dublin	Ирландия
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali	Bologna	Италия
Regione Veneto Unita Perifericca per i Servizi Fitosanitari	Verona	Италия
Nederlandse Algemene Keuringsdienst	Emmeloord	Холандия
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Холандия
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lisbon	Португалия
Centro Diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	Испания
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias	Valencia	Испания
Swedish University of Agricultural Sciences	Uppsala	Швеция
(1) Учени за контакти: виж интернет страница http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main .		

Допълнение 2

Хранителни среди за изолиране и култивиране на *R. solanacearum*

(a) Общи хранителни среди:

Nutrient agar (NA)	
Nutrient agar (Difco)	23,0 g
Distilled water	1,0 L

Съставките се разтварят и средата се автоклавира при 121°C за 15 минути.
Yeast Peptone Glucose Agar (YPGA)

Yeast extract (Difco)	5,0 g
Bacto-peptone (Difco)	5,0 g
D(+)-Glucose (monohydrate)	10,0 g
Bacto-Agar (Difco)	15,0 g
Distilled water	1,0 L

Съставките се разтварят и средата се автоклавира при 121°C за 15 минути.
Sucrose Peptone Agar (SPA)

Sucrose	20,0 g
Bacto-peptone (Difco)	5,0 g

K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g
Vacto-Agar (Difco)	15,0 g
Distilled water	1,0 L
pH 7,2 - 7,4	

Съставките се разтварят и средата се автоклавира при 121°C за 15 минути.
Тетразолна среда на Kelman

Casamino acids (Difco)	1,0 g
Vacto-peptone (Difco)	10,0 g
Dextrose	5,0 g
Vacto-Agar (Difco)	15,0 g
Distilled water	1,0 L

Съставките се разтварят и средата се автоклавира при 121°C за 15 минути.
Средата се охлажда до 50°C и се добавя на капки стерилизиран разтвор на 2,3,5-трифенил тетразолиев хлорид (Sigma) за получаване на финална концентрация от 50 mg на L.

(б) Валидирани селективни хранителни среди:
SMSA (Englebrecht, 1994, с измененията от Elphinstone et al., 1996)
Основна среда

Casamino acids (Difco)	1,0 g
Vacto-peptone (Difco)	10,0 g
Glycerol	5,0 ml
Vacto-Agar (Difco); виж забележка 2	15,0 g
Distilled water	1,0 L

Съставките се разтварят и средата се автоклавира при 121°C за 15 минути.
Средата се охлажда до 50°C и се добавят на капки филтрирани и стерилизирани водни разтвори на следните съставки за получаване на определените крайни концентрации:

Crystal Violet (Sigma)	5 mg на l
Polymyxin-B-Sulphate (Sigma P-1004)	600 000 U (около 100 mg) на l
Bacitracin (Sigma B-0125)	1250 U (около 25 mg) на l
Chloramphenicol (Sigma C-3175)	5 mg на l

Penicillin-G (Sigma P-3032)	825 U (около 0,5 mg) на l
2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (Sigma)	50 mg на l

Забележки:

1. Използването на реагенти, различни от определените по-горе, може да окаже влияние върху растежа на *R. solanacearum*.

2. Може да се използва Oxoid Agar # 1 вместо Vacto-Agar (Difco). В такъв случай растежът на *R. solanacearum* ще се забави, въпреки че растежът на конкурентните сапрофити може също да се редуцира. За появата на типичните колонии на *R. solanacearum* може да са необходими 1 до 2 дни повече, а червеното оцветяване може да е по-светло, отколкото при Vacto-Agar (Difco).

3. Увеличена концентрация на бацитрацина до 2500 U на l може да редуцира популациите от конкурентни бактерии, без да засегне растежа на *R. solanacearum*.

Средите и разтворените антибиотици се съхраняват при 4°C на тъмно и се използват в срок от един месец.

Преди използване по повърхността на петритата не трябва да има влага.

Да се избягва прекомерно изсушаване на петритата.

Качествен контрол трябва да се осъществява след приготвянето на всяка нова партида хранителна среда, като се прави посявка на суспензия от референт на щам на *R. solanacearum* (виж Допълнение 3) и се наблюдава за появата на типични колонии след инкубиране при 28°C за два до пет дни.

(в) Утвърдена хранителна среда за обогатяване

SMSA Broth (Elphinstone et al., 1996)

Приготвя се като SMSA, но се изключват Vacto-Agar и 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride.

Модифицирана Wilbrink broth (Caruso et al., 2002)

Sucrose	10 g
Proteose peptone	5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,25 g
NaNO ₃	0,25 g
Distilled water	1 L

Съставките се разтварят, средата се автоклавира при 121°C за 15 минути и се охлажда до 50°C.

Добавят се разтворените антибиотици както при SMSA хранителна среда.

Допълнение 3

A. Стандартизиран контролен материал, предлаган в търговската мрежа

(a) Бактериални изолати

Препоръчва се използването на следните бактериални изолати като стандартен референтен материал или като положителни контроли (таблица 1), или при оптимизиране на тестовете за избягване на кръстосани реакции (таблица 2). Всички щамове могат да се закупят от:

1. National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPBB), Central Science Laboratory, York, UK.

2. Culture Collection of the Plant Protection Service (PD), Wageningen, the Netherlands.

3. Collection Francaise de Bactries Phytopathogenes (CFBP), INRA Station Phytobacteriologie, Angers, France.

Таблица 1. SMT референтна група от изолати на *R. solanacearum*

NCPPB код	SMT #	Други кодове	Произход	Био - вар
NCPPB 4153	6	CFBP 4582, Pr 3020, EURS11	Египет	2
NCPPB 4154	10	CFBP 4585, 550, EURS21	Турция	2
NCPPB 3857	12	CFBP 4587, Pr 1140, EURS26	Англия	2
NCPPB 1584	23	CFBP 4598, EURS49	Кипър	2
NCPPB 2505	24	CFBP 4599, EURS50	Швеция	2
NCPPB 4155	26	CFBP 4601, 502, EURS55	Белгия	2
NCPPB 4156 (*)	71(*)	PD 2762, CFBP 3857	Холандия	2
NCPPB 4157	66	LNPV 15.59	Франция	2
NCPPB 4158	39	CFBP 4608, Port 448, EURS80	Португалия	2
NCPPB 4160	69	IVIA-1632-2	Испания	2
NCPPB 4161	76	B3B	Германия	2
NCPPB 325	41	CFBP 2047, KEL60-1, R842	САЩ	1
NCPPB 3967	42	CFBP 4610, R285, GONg7	Коста Рика	1
NCPPB 4028	43	CFBP 4611, R303/571, CIP310, SEQ205	Колумбия	2
NCPPB 3985	44	CFBP 4612, R578, CIP312	Перу	2Г
NCPPB 3989	45	CFBP 4613, R568,		

		CIP226	Бразилия	2Т
NCPPB 3996	46	CFBP 3928, R276/355, CIP72, SEQ225	Перу	3
NCPPB 3997	47	CFBP 4614, R280/363, CIP49, HAY0131a	Австралия	3
NCPPB 4029	48	CFBP 4615, R297/349, CIP121, CM1b2861	Шри Ланка	4
NCPPB 4005	49	CFBP 4616, R470	Филипини	4
NCPPB 4011	50	CFBP 4617, R288, HEmps2	Китай	5

(1) Използва се като стандартен референтен щам на *R. solanacearum* биовар 2 (раса 3).

Забележка. Автентичността на щамовете, дадени по-горе, е гарантирана само ако са получени от автентична култивирана колекция.

Таблица 2. SMT референтна група на серологично или генетично свързани бактерии, предназначени за използване при оптимизиране на тестовете за откриване на бактерии

NCPPB код	SMT #	Други кодове	Идентификация
NCPPB 4162	51	CFBP 1954	<i>Bacillus polymyxa</i> (1)
NCPPB 4163	52	CFBP 1538	<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i> (1)
NCPPB 4164	-	CFBP 2227	<i>Burkholderia cepacia</i> (2)
NCPPB 4165	-	CFBP 2459	<i>Ralstonia pickettii</i> (2)
NCPPB 4166	58	CFBP 3567	<i>Ralstonia pickettii</i> (1)
		CSL Pr1150	
NCPPB 4167	60	CFBP 4618 PD 2778	<i>Ralstonia</i> sp. (1)
NCPPB 1127	53	CFBP 3575	<i>Burkholderia andropogonis</i> (1)
NCPPB 353	54	CFBP 3572	<i>Burkholderia caryophylli</i> (1)
NCPPB 945	55	CFBP 3569	<i>Burkholderia cepacia</i> (1)
NCPPB 3708	56	CFBP 3574	<i>Burkholderia glumae</i> (1)
NCPPB 3590	57	CFBP 3573	<i>Burkholderia plantarii</i> (1)
NCPPB 3726	59	CFBP 3568	Banana Blood Disease Bacterium (1) (2) (3)
NCPPB 4168	61	CFBP 4619 IPO S339	<i>Enterobacter</i> sp. (1)

NCPPB 4169	62	IPO 1695	Enterobacter sp. (1)
NCPPB 4170	63	CFBP 4621 IPO S306	Ochrobactrum anthropi (1) (2)
NCPPB 4171	64	CFBP 4622 IPO 1693	Curtobacterium sp. (1) (2)
NCPPB 4172	65	IPO 1696a	Pseudomonas sp. (1)
NCPPB 4173	-	PD 2318	Aureobacterium sp. (2)
NCPPB 4174	81	IVIA 1844.06	Flavobacterium sp. (1) (2)

(1) Щам с потенциално кръстосано реагиране в серологични тестове (IF и/или ELISA) с поликлонални антисеруми.

(2) Щам, от който в някои лаборатории може да се амплифицира PCR продукт със сходен размер на този, очакван при използването на специфичните праймери OLI-1 и Y-2 (виж Допълнение б).

(3) Вероятност за кръстосана реакция в повечето тестове, но се наблюдават само по бананите в Индонезия.

(б) Стандартизиран контролен материал в търговската мрежа

Стандартен контролен материал може да се достави от колекцията от култури на NCPPB.

Замразена и изсушена утайка от картофен екстракт от 200 здрави картофени клубени като отрицателна контрола за всички тестове.

Замразена и изсушена утайка от картофен екстракт от 200 здрави картофени клубени, съдържащи от 103 до 104 и от 104 до 106 клетки на *R. solanacearum* биовар 2 (щам NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857), като положителни контроли за серологични и PCR тестове. Тъй като замразяването и изсушаването се отразяват на жизнеспособността, те не са подходящи за стандартни контроли за изолация и биологичен тест.

Фиксирани с формалин суспензии на *R. solanacearum* биовар 2 (щам NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) с 106 клетки на ml като положителни контроли за серологични тестове.

Б. Приготвяне на положителни и отрицателни контроли за основните скринингови тестове PCR/IF и FISH

Произвежда се 48-часова култура на вирулентен щам на *R. solanacearum*, раса 3/биовар 2 (например щам NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) върху SMSA среда и се суспендира в 10 mM фосфатен буфер за получаването на гъстота на клетките приблизително 2×10^8 клетки на ml. Това обикновено се получава с леко замътнена суспензия, еквивалентна на оптична плътност от 0,15 при 600 nm.

Вземат се конусите на 200 клубени от произведен сорт с бяла кора, за който се знае, че не е заразен с *R. solanacearum*.

Конусчетата се обработват по обичайния начин и утайката се суспендира повторно в 10 ml.

Приготвят се 10 стерилни по 1,5 ml микропруветки с 900 μ l от разтворената утайка.

Прехвърлят се 100 μ l от суспензията на *R. solanacearum* в първата микропруветка. Разбърква се на Vortex.

Определят се десетичните нива на зараза чрез продължаване на разреждането в

следващите пет микропруветки.

Шестте заразени микропруветки се използват като положителни контроли. Четирите незаразени микропруветки се използват като отрицателни контроли. Микропруветките се етикетират.

Приготвят се аликвоти от по 100 µl в стерилни по 1,5 ml микропруветки и така се получават девет точни копия на всяка контролна проба. Съхраняват се при -16 до -24°C до използването им.

Наличието и количественото определяне на *R. solanacearum* в контролните проби трябва да се потвърдят най-напред с IF тест.

За PCR теста се прави екстракция на ДНК от положителни и отрицателни контроли при всяка серия от проби за тестване.

За IF и FISH тестовете се правят тествания върху положителни и отрицателни контроли при всяка серия проби за тестване.

За IF, FISH и PCR тествания трябва да се установи наличие на *R. solanacearum* в най-малко 106 и 104 клетки/ml на положителните контроли и нито една клетка в отрицателните контроли.

Допълнение 4

Необходими буфери за тестовете

Обща разпоредба: Неотворените стерилизирани буфери могат да се съхраняват до една година.

1. Буфери за екстракция

1.1. Буфер за екстракция - Extraction buffer (50 mM фосфатен буфер, pH 7,0)

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

Na₂HPO₄ (anhydrous) - 4,26 g

KH₂PO₄ - 2,72 g

Дестилирана вода - 1,00 L

Съставките се разтварят, проверява се pH и се автоклавират при 121°C за 15 минути.

Могат да бъдат полезни и следните допълнителни съставки:

	Предназначение	Количество (на l)
Lubrol	Дефлокулант (*)	0,5 g
DC silicone antifoam	Антипенител (*)	1,0 ml
Tetrasodium pyrophosphate	Антиоксидант	1,0 g
Polyvinylpyrrolidone- 40000 (PVP-40)	Свързване на PCR инхибитори	50 g

(*) Използва се с метода за хомогенизирана екстракция.

1.2. Буфер за разтваряне на утайката - Pellet buffer (50 mM фосфатен буфер, pH

7,2)

Този буфер се използва за разреждане на екстракти от конусчетата на картофени клубени след концентрацията им в утайки чрез центрофугиране.

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

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

Дестилирана вода - 1,0 L

Съставките се разтварят, проверява се рН и се автоклавира при 121°C за 15 минути.

2. Буфери за IF тест

2.1. IF-буфер (10 mM фосфатен буфер (PBS), рН 7,2)

Този буфер се използва за разреждане на антитела.

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

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

NaCl - 8,0 g

Дестилирана вода - 1,0 L

Съставките се разтварят, проверява се рН и се автоклавира при 121°C за 15 минути.

2.2. IF-буфер-Tween

Този буфер се използва за измиване на предметните стъкла.

Прибавя се 0,1 % Tween 20 към IF буфера.

2.3. Фосфатен буферен глицерин, рН 7,6

Този буфер се използва за монтиране на покривните стъкла върху гнездата на предметните стъкла за IF тест и за усилване на флуоресценцията.

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

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

Глицерин - 50 ml

Дестилирана вода - 100 ml

Предпазващи от обезцветяване разтвори могат да се закупят например от VectashieldT (Vector Laboratories) или CitifluorT (Leica).

3. Буфери за индиректна ELISA

3.1. Карбонатен буфер с двойна концентрация (Coating buffer), рН 9,6

Na_2CO_3 - 6,36 g

NaHCO_3 - 11,72 g

Дестилирана вода - 1,0 L

Съставките се разтварят, проверява се рН и се автоклавира при 121°C за 15 минути.

Може да се добави натриев сулфит (0,2 %) като антиоксидант, ако е необходимо да се предотврати изграждането на окислени ароматни съединения.

3.2. 10X Фосфатен буфер - PBS, рН 7,4

NaCl - 80,0 g

KH_2PO_4 - 2,0 g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - 29,0 g

KCl - 2,0 g

Дестилирана вода - 1,0 L

3.3. Фосфатен буфер с Tween (PBS-Tween)

10X PBS - 100 ml

10 % Tween 20 - 5 ml

Дестилирана вода - 895 ml
3.4. Блокиращ (антитяло) буфер (трябва да е прясно изготвен)
10X PBS - 10,0 ml
Polyvinylpyrrolidone-44000 - 2,0 g
(PVP-44)
10 % Tween 20 - 0,5 ml
Мляко на прах - 0,5 g
Дестилирана вода - Допълва се до 100 ml
3.5. Алкален фосфатазно-субстратен разтвор, pH 9,8
Diethanolamine - 97 ml
Дестилирана вода - 800 ml
Съставките се разбъркват и се регулира pH до 9,8 с концентрирана HCl.
Долива се до 1 L с дестилирана вода.
Прибавят се 0,2 g MgCl₂.
Разтварят се 2 фосфатазни субстратни таблетки от 5 mg (Sigma) на 15 ml разтвор.
4. Буфери за DAS ELISA
4.1. Карбонатен буфер - Coating buffer, pH 9,6
Na₂CO₃ - 1,59 g
NaHCO₃ - 2,93 g
Дестилирана вода - 1000 ml
Съставките се разтварят и се проверява pH 9,6.
4.2. 10X Фосфатен буфер (PBS), pH от 7,2 до 7,4
NaCl - 80,0 g
NaH₂PO₄·2H₂O - 4,0 g
Na₂HPO₄·12H₂O - 27,0 g
Дестилирана вода - 1000 ml
4.3. PBS-Tween
10X PBS - 50 ml
10 % Tween 20 - 5 ml
Дестилирана вода - 950 ml
4.4. Субстратен буфер (Substrate buffer), pH 9,8
Diethanolamine - 100 ml
Дестилирана вода - 900 ml
Съставките се разбъркват и се регулира pH до 9,8 с концентрирана HCl.

Допълнение 5

Определяне на степента на заразяване при IF и FISH тестовете

1. Изчислява се средният брой типични флуоресцентни клетки за наблюдателно поле (с).
2. Изчислява се броят на типичните флуоресцентни клетки за гнездо на микроскопско предметно стъкло (С).

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

където: S е повърхността на гнездо на предметното стъкло за IF
и s = повърхността на полето на обектива

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

където: i е коефициентът на полето (варира от 8 до 24 в зависимост от окуляра);
K - коефициентът на тръбичката (1 или 1,25);
G - увеличението на обектива (100x, 40x и т. н.).

3. Изчислява се броят на типичните флуоресцентни клетки за ml разтворена утайка (N).

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

където: y е количеството на разтворената утайка (концентрирания екстракт) на гнездо;
и F = коефициентът на разреждане на разтворената утайка (концентрирания екстракт).

Допълнение 6

Валидирани PCR протоколи и реагенти

NB: Предварителното тестване трябва да позволява откриване на 103 до 104 клетки на *R. solanacearum* на ml екстракт от проба.

Предварителното тестване не трябва да показва никакви фалшиви положителни резултати за група от избрани бактериални щамове (виж Допълнение 3).

PCR протокол на Seal et al. (1993)

1.1. Олигонуклеотидни праймери

Прав праймер 5'-GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC-3'
OLI-1
Обратен праймер 5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'
Y-2

Очакван размер на фрагмента от *R. solanacearum* матрична ДНК = 288 бд

1.2. Микс за PCR реакцията

Реагент	Количество за реакция	Крайна концентрация
Стерилна ултрачиста вода	17,65 µl	
10X PCR буфер (1) (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
dNTP микс (20 mM)	0,25 µl	0,2 mM
Праймер OLI-1 (20 µM)	1,25 µl	1 µM

Праймер Y-2 (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Taq полимераза (5U/µl) (1)	0,1 µl	0,5 U
Обем на пробата	2,0 µl	
Общ обем:	25 µl	

(1) Методът е утвърден, като е използвана Taq полимераза от Perkin Elmer (AmpliTaq) и Gibco BRL.

1.3. Условия за PCR реакцията

Преминава се следната програма:

1 цикъл от	а)	2 минути при 96°C (денатурация на матрична ДНК)
35 цикъла от	б)	20 секунди при 94°C (денатурация на матрична ДНК)
	в)	20 секунди при 68°C (хибридизация на праймерите)
	г)	30 секунди при 72°C (удължаване на копията)
1 цикъл от	д)	10 минути при 72°C (окончателно удължаване)
	е)	спиране при 4°C.

NB: Тази програма е оптимизирана за използване с термоциклично устройство (термоцикльор) - Perkin Elmer 9600. При използване с други модели може да е необходима модификация на продължителността на стъпки б), в) и г).

1.4. Анализ на фрагментите по отношение на рестрикционните ензими

PCR продуктите, амплифицирани от ДНК на *R. solanacearum*, произвеждат ясно изразен полиморфизъм по дължината на рестрикционните фрагменти с ензим Ava II след инкубация при 37°C.

PCR протокол на Pastrik и Maiss (2000)

2.1. Олигонуклеотидни праймери

Прав праймер Ps-1 5'- agt cga acg gca gcg ggg g - 3'
 Обратен праймер Ps-2 5'- ggg gat ttc aca tcg gtc ttg ca - 3'

Очакван размер на фрагмент от *R. solanacearum* матрична ДНК = 553 бд (базови двойки).

2.2. Микс за PCR реакцията

Реагент	Количество за реакция	Крайна концентрация
Стерилна ултрачиста вода	16,025 µl	
10X PCR буфер (1)	2,5 µl	1X (1,5 mM)

BSA (фракция V) (10 %)	0,25 µl	MgCl ₂) 0,1 %
d-nTP микс (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Праймер Ps-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Праймер Ps-2 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Таq полимераза (5U/µl) (1)	0,1 µl	0,5 U
Обем на пробата	5,0 µl	
Общ обем:	25,0 µl	

(1) Методите са валидирани, като е използвана Таq полимераза от Perkin Elmer (AmpliTa_q) и Gibco BRL.

N.B. Първоначално оптимизирани за MJ Research PTC 200

термоцикълор с Gibco Таq полимераза.

Perkin Elmer AmpliTa_q и буфер могат също да се използват при същите концентрации.

2.3. Условия за PCR реакцията

Премахва се следната програма:

1 цикъл от	а)	5 минути при 95°C (денатурация на матрична ДНК)
35 цикъла от	б)	30 секунди при 95°C (денатурация на матрична ДНК)
	в)	30 секунди при 68°C (хибридизация на праймерите)
	г)	45 секунди при 72°C (удължаване на копията)
1 цикъл от	д)	5 минути при 72°C (окончателно удължаване)
	е)	спиране при 4°C.

NB: Тази програма е оптимизирана за използване с термоцикълор MJ Research PTC 200. При използване с други модели може да е необходима модификация на продължителността на стъпки б), в) и г).

2.4. Анализ на фрагментите по отношение на рестрикционните ензими.

PCR продуктите, амплифицирани от ДНК на *R. solanacearum*, произвеждат ясно изразен полиморфизъм по дължината на рестрикционните фрагменти с ензим Таq I след инкубиране при 65°C за 30 минути. Рестрикционните фрагменти, получени от специфичен за *R. solanacearum* фрагмент, са с размери 457 бд и 96 бд (базови двойки).

3. Сложен PCR протокол с вътрешна PCR контрола (Patrik et al., 2002)

3.1. Олигонуклеотидни праймери

Прав праймер RS-1-F	5'- ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA -3'
Обратен праймер RS-1-R	5'- CCC AGT CAC GGC AGA GAC T -3'
Прав праймер	5'- AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G -3'

NS-5-F

Обратен праймер 5'- GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC -3'

NS-6-R

Очакван размер на фрагмент от *R. solanacearum* матрична ДНК = 718 бд (набор RS-праймери)

Очакван размер на фрагмент от 18S рРНК вътрешна PCR контрола = 310 бд (набор NS-праймери)

3.2. Микс за PCR реакцията

Реагент	Количество за реакция	Крайна концентрация
Стерилна ултрачиста вода	12,625 µl	
10X PCR буфер (1)	2,5 µl	1X
(15 mM MgCl ₂)		(1,5 mM MgCl ₂)
BSA (фракция V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
d-NTP микс (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Праймер RS-1-F (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Праймер RS-1-R (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Праймер NS-5-F (10 µM) (2)	0,15 µl	0,06 µM
Праймер NS-6-R (10 µM) (2)	0,15 µl	0,06 µM
Таq полимераза (5 U/µl) (1)	0,2 µl	1,0 U
Обем на пробата	5,0 µl	
Общ обем:	25,0 µl	

(1) Методите са валидирани, като е използвана Таq полимераза от Perkin Elmer (AmpliТаq) и Gibco BRL.

(2) Концентрацията на праймерите NS-5-F и NS-6-R са оптимизирани за екстракция на картофени конуси, като се използва методът на хомогенизиране и пречистване на ДНК според Пастрик (2000) (виж Раздел VI.A.6.1.a.). Повторна оптимизация на концентрациите на реагентите е необходима, когато е използвана екстракция, чрез разклащане или други методи за изолиране на ДНК.

3.3. Условия за PCR реакцията

Преминава се следната програма:

- | | | |
|---------------|----|---|
| 1 цикъл от: | а) | 5 минути при 95°C (денатурация на матрична ДНК) |
| 35 цикъла от: | б) | 30 секунди при 95°C (денатурация на матрична ДНК) |
| | в) | 30 секунди при 58°C (хибридизация на праймерите) |
| | г) | 45 секунди при 72°C (удължаване на копията) |
| 1 цикъл от: | д) | 5 минути при 72°C (окончателно) |

- удължаване)
е) спиране при 4°C.

NB: Тази програма е оптимизирана за използване с термоцикълор MJ Research PTC 200. При използване с други модели може да е необходима модификация на продължителността на стъпки б), в) и г).

3.4. Анализ на фрагментите по отношение на рестрикционните ензими.

PCR продуктите, амплифицирани от ДНК на *R. solanacearum*, произвеждат ясно изразен полиморфизъм по дължината на рестрикционните фрагменти с ензим Bsm I или с Isoschizomere (например Mva 1269 I) след инкубация при 65°C за 30 минути.

4. Специфичен за биовари на *R. solanacearum* PCR протокол (Patrik et al., 2001)

4.1. Олигонуклеотидни праймери

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

Очакван размер на фрагмента от *R. solanacearum* матрична ДНК:

с Rs-1-F/ Rs-1-R = 718 бд (базови двойки);

с Rs-1-F/ Rs-3-R = 716 бд (базови двойки).

4.2. Миксове за PCR реакциите

(а) PCR специфичен за биовар 1/2

Реагент	Количество за реакция	Крайна концентрация
Стерилна ултрачиста вода	12,925 µl	
10X PCR буфер (1)	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (фракция V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
d-NTP микс (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Праймер Rs-1-F (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Праймер Rs-1-R (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Таq полимераза (5U/µl) (1)	0,2 µl	1 U
Обем на пробата	5,0 µl	
Общ обем:	25,0 µl	

(1) Методите са валидирани, като е използвана Таq полимераза от Perkin Elmer (AmpliTa_q) и Gibco BRL.

(б) PCR специфичен за биовар 3/4/5

Реагент	Количество	Крайна кон-
---------	------------	-------------

	за реакция	центрация
Стерилна ултрачиста вода	14,925 µl	
10X PCR буфер (1)	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (фракция V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
d-NTP микс (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Праймер Rs-1-F (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Праймер Rs-3-R (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Таq полимераза (5U/µl) (1)	0,2 µl	1 U
Обем на пробата	5,0 µl	
Общ обем:	25,0 µl	

(1) Методите са валидирани, като е използвана Таq полимераза от Perkin Elmer (AmpliTa_q) и Gibco BRL.

4.3. Условия за PCR реакцията

Преминават се следните програми за специфичните реакции на двата биовар 1/2 и биовар 3/4/5:

- | | | |
|---------------|----|---|
| 1 цикъл от: | а) | 5 минути при 95°C (денатурация на матрична ДНК) |
| 35 цикъла от: | б) | 30 секунди при 95°C (денатурация на матрична ДНК) |
| | в) | 30 секунди при 58°C (хибридизация на праймерите) |
| | г) | 45 секунди при 72°C (удължаване на копията) |
| 1 цикъл от: | д) | 5 минути при 72°C (окончателно удължаване) |
| | е) | спиране при 4°C. |

NB: Тази програма е оптимизирана за използване с термоцикълор MJ Research PTC 200. При използване с други модели може да е необходима модификация на продължителността на стъпки б), в) и г).

4.4. Анализ на фрагментите по отношение на рестрикционните ензими.

PCR продуктите, амплифицирани от ДНК на *R. solanacearum*, като се използват праймерите Rs-1-F и Rs-1-R, произвеждат ясно изразен полиморфизъм по дължината на рестрикционните фрагменти с ензим Bsm I или с Isoschizomere (например Mva 1269 I) след инкубация при 65°C за 30 минути. PCR продуктите, амплифицирани от ДНК на *R. solanacearum*, като се използват праймерите Rs-1-F и Rs-3-R, нямат рестрикционни местоположения.

5. Приготвяне на зареждащия буфер (loading buffer)

5.1. Bromphenol blue (10 % стоков разтвор)

Bromphenol blue - 5 g

Дестилирана вода (двойно дестилирана) - 50 ml

5.2. Зареждащ буфер (Loading buffer)

Glycerol (86 %) - 3,5 ml
Bromphenol blue (5,1) - 300 µl
Дестилирана вода (двойно дестилирана) - 6,2 ml
6. 10X Tris Acetate EDTA (ТАЕ) буфер, рН 8,0
Tris buffer - 48,40 g
Ледена оцетна киселина - 11,42 ml
EDTA (disodium salt) - 3,72 g
Дестилирана вода - 1,00 L
Разрежда се до 1X преди употреба.
Разпространява се в търговската мрежа (например Invitrogen или негов еквивалент).

Допълнение 7

Валидирани реагенти за FISH тест

1. Олиго-праймери

Специфичен прајмер за *R. solanacearum* OLI-1-CY3: 5'-ggc agg tag caa gct acc ccc-3'

Неспецифичен еубактериален прајмер EUB-338-FITC: 5'-gct gcc tcc cgt agg agt-3'

2. Фиксиращ разтвор

(ВНИМАНИЕ! ФИКСАТОРЪТ СЪДЪРЖА ПАРАФОРМАЛДЕХИД, КОЙТО Е ТОКСИЧЕН. ТРЯБВА ДА СЕ ИЗПОЛЗВАТ РЪКАВИЦИ, ДА НЕ СЕ ВДИШВА И ДА СЕ РАБОТИ В КАМИНА.)

а) Загряват се 9 ml молекулярна вода (например ултрачиста вода (UPW) до приблизително 60°C и се добавя 0,4 g параформалдехид. Параформалдехидът се разтваря след добавяне на 5 капки 1N NaOH и разбъркване с магнитна бъркалка.

б) Регулира се рН до 7,0 чрез добавяне на 1 ml 0,1M фосфатен буфер (PB; рН 7,0) и 5 капки 1N HCl. Проверява се рН с индикаторни лентички и при необходимост се регулира с HCl или NaOH. (ВНИМАНИЕ! ДА НЕ СЕ ИЗПОЛЗВА РН МЕТЪР В РАЗТВОРИ С ПАРАФОРМАЛДЕХИД.)

в) Разтворът се филтрира през 0,22 µm мембранен филтър и се предпазва от запрашаване при 4°C до следващата употреба.

3. 3X Hybmix

NaCl - 2,7 M

Tris-HCl - 60 mM (рН 7,4)

EDTA (филтриран и автоклавиран) - 15 mM

Разрежда се до 1X съгласно изискванията.

4. Хибридиращ разтвор (Hybridisation solution)

1X Hybmix

Sodium dodecyl sulphate (SDS) - 0,01 %

Formamide - 30 %

Прајмер EUB 338 - 5 ng/µl

Прајмер OLI-1 или OLI-2 - 5 ng/µl

Приготвя се хибридиращ разтвор в количества, които се определят по

таблица 1. За всяко предметно стъкло (съдържащо по два броя от 2 различни проби) е необходим 90 µl хибридиращ разтвор. ВАЖНО! ФОРМАМИДЪТ Е МНОГО ТОКСИЧЕН И Е НЕОБХОДИМО ДА СЕ ИЗПОЛЗВАТ РЪКАВИЦИ И ДА СЕ ВЗЕМАТ НЕОБХОДИМИТЕ ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ!

Таблица 1. Предложени количества за приготвяне на микс за хибридизация

Брой на предметните стъкла	1	4	6	8	10
Стерилна ултрачиста вода	23,1	92,4	138,6	184,8	231,0
3x hybrid mix	30,0	120,0	180,0	240,0	300,0
1 % SDS	0,9	3,6	5,4	7,2	9,0
Formamide	27,0	108,0	162,0	216,0	270,0
Праймер EUB 338 (100 ng/µl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Праймер OLI-1 или OLI-2 (100 ng/µl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Общ обем (µl)	90,0	360,0	540,0	720,0	900,0

NB: Всички разтвори, съдържащи чувствителни на светлина олиго-праймери, се съхраняват на тъмно и при -20°C.

При употреба се предпазват от пряка слънчева светлина или електрическа светлина.

5. 0,1M фосфатен буфер, pH 7,0

Na₂HPO₄ - 8,52 g

KH₂PO₄ - 5,44 g

Дестилирана вода - 1,00 L

Съставките се разтварят, проверява се pH и се автоклавира при 121°C за 15 минути.

Допълнение 8

Култивиране на патладжанени и домати растения

Посяват се семена на домати (*Lycopersicon esculentum*) или патладжани (*Solanum melongena*) в подходяща торо-почвена смес. Разсадът с напълно развити котиледони (10 до 14 дни) се пикира в подходящи саксии.

Патладжаните и домати трябва да се отглеждат в оранжерия при следните условия преди инокулация:

Продължителност на деня 14 часа или естествена-та продължителност на деня, ако е по-голяма;

Температура	дневна 21 до 24°C, нощна 14 до 18°C.
Чувствителен сорт домати	"Moneymaker"
Чувствителен сорт патладжани	"Black Beauty"
Доставчици	Виж интернет страница http://forum.europa.eu.int/ Public/irc/sanco/Home/main

ЛИТЕРАТУРА

1. Amann, R.I., L. Krumholz and D.A. Stahl. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172: 762-770.
2. Anon. 1998. Council Directive 98/57/EC of 20 July 1998 on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Official Journal of the European Communities L235, 1-39.
3. Boudazin, G., A.C. Le Roux, K. Josi, P. Labarre and B. Jouan. 1999. Design of division specific primers of *Ralstonia solanacearum* and application to the identification of European isolates. *European Journal of Plant Pathology* 105; 373-380.
4. Caruso, P., Gorris, M.T., Cambra, M., Palomo, J.L., Collar, J and Lopez, M.M. 2002. Enrichment Double-Antibody Sandwich Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay That Uses a Specific Monoclonal Antibody for sensitive Detection of *Ralstonia solanacearum* in Asymptomatic Potato Tubers. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3634-3638.
5. Cook, D., Barlow, E. and Sequeira, L. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 1:113-121.
6. Elphinstone, J.G., Hennessy, J., Wilson, J.K. and Stead, D.E. 1996. Sensitivity of detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. *EPPO Bulletin* 26; 663-678.
7. Englebrecht, M.C. (1994) Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. In: A.C. Hayward (ed.) *Bacterial Wilt Newsletter* 10, 3-5. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.
8. Hayward, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 27; 265-277.
9. Hayward, A.C., El-Nashaar, H.M., Nydegger, U. and De Lindo, L. 1990. Variation in nitrate metabolism in biovars of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 69; 269-280.
10. Ito, S., Y. Ushijima, T. Fujii, S. Tanaka, M. Kameya-Iwaki, S. Yoshiwara and F. Kishi. 1998. Detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in soil using a semi-selective medium and a PCR technique. *J. Phytopathology* 146; 379-384.
11. Janse, J.D. (1988) A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 18, 343-351.
12. Janse, J.D. 1991. Infra- and intra-specific classification of *Pseudomonas*

solanacearum strains using whole cell fatty-acid analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 14; 335-345.

13. Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44; 693-695.

14. Klement Z.; Rudolph, K and D.C. Sands, 1990. *Methods in Phyto bacteriology*. Akademiai Kiado, Budapest, 568 pp.

15. Lelliott, R.A. and Stead, D.E. 1987. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. Blackwell scientific Publications Ltd., Oxford. 216 pp.

16. Lopez, M.M., Gorris, M.T., Llop, P., Cubero, J., Vicedo, B., Cambra, M., 1997. Selective enrichment improves selective isolation, serological and molecular detection of plant pathogenic bacteria. In: H.W. Dehne et al., (eds). *Klewer Academic Publishers*. pp. 117-121.

17. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J., 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2286-2295.

18. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85; 528-536.

19. Opina, N., F. Tavner, G. Holloway, J.-F Wang, T.-H Li, R. Maghirang, M. Fegan, A.C. Hayward, V. Krishnapillai, W.F. Hong, B.W. Holloway, J.N. Timmis. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *As Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 5; 19-33.

20. Pstrik, K.H. and Maiss, E. 2000. Detection of *R. solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. *J. Phytopathology* 148; 619-626.

21. Pstrik, K.H., Elphinstone, J.G. and Pukall, R. 2002. Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification of 16S-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control. *European Journal of Plant Pathology* 108, 831-842.

22. Robinson-Smith, A., Jones, P., Elphinstone, J.G. and Forde, S.M.D. (1995) Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. *Food and Agricultural Immunology* 7, 67-79.

23. Schaad, W. 2001. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. Schaad [Hrsg.]. - 3. ed.; St. Paul, Minnesota: 373 pp.

24. Seal, S.E., L.A. Jackson, J.P.W. Young, and M.J. Daniels. 1993. Detection of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *J. Gen. Microbiol.* 139: 1587-1594.

25. Smith, J.J., Offord, L.C., Holderness, M. and Saddler, G.S. 1995. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. *Applied and Environmental Microbiology* 61; 4262-4268.

26. Stead, D.E. 1992. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty-acid profiles. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42; 281-295.

27. Taghavi, M., Hayward, A.C., Sly, L.I., Fegan, M. 1996. Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. *International*

Journal of Systematic Bacteriology 46; 10-15.

28. Van Der Wolf, J.M., Bonants, P.J.M., Smith, J.J., Hagenaar, M., Nijhuis, E., Van Beckhoven, J.R.C., Saddler, G.S., Trigalet, A., Feuillade, R. 1998. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* Race 3 in Western Europe as determined by AFLP, RC-PFGE and rep-PCR. In: Prior, P., Allen, C. and Elphinstone, J. (eds.) Bacterial wilt disease: Molecular and Ecological Aspects. Springer (Berlin) pp. 44-49.

29. Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N., Stead, D.E. and Boonham, N. 1999. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains using an automated and quantitative fluorescent 5' nuclease TaqMan assay. Applied and Environmental Microbiology 66; 2853-2858.

30. Wullings, B.A., A.R. van Beuningen, J.D. Janse and A.D.L. Akkermans. 1998. Detection of *R. solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent in situ hybridization with 23s rRNA-targeted probes. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4546-4554.

Приложение № 3 към чл. 4, ал. 1

(Предишно Приложение № 2 към чл. 4, изм. - ДВ, бр. 28 от 2007 г., в сила от 01.04.2007 г.)

1. При всяко съмнение за наличие, за което е идентифициран положителен резултат в скрининговия тест/скрининговите тестове, за изброения растителен материал и за всички други случаи, в съответствие с методите, посочени в приложение № 2, и за което се очаква потвърждаване или отхвърляне при приключване на упоменатите методи, следва да се извършат задържане и подходящо съхраняване на:

- всички клубени, от които са взети проби, а при възможност и всички растения, от които са взети проби,

- останал екстракт и допълнително изготвен материал за скрининговия тест/скрининговите тестове, например имунофлуоресцентни предметни стъкла,

и

- цялата документация, до приключването на упоменатите методи.

Запазването на клубените позволява провеждането на сортово изпитване, когато е необходимо.

2. В случай на потвърждаване наличието на вредителя следва да се извърши задържане и подходящо съхраняване на:

- материала, определен в т. 1,

- проба от заразения материал от домати или син домати, инокулиран с екстракт от клубен или растение, в зависимост от случая,

и

- изолираната култура на вредителя,

за период поне един месец след процедурата за уведомяване съгласно чл. 5, ал. 1 и 2.

Приложение № 4 към чл. 5, ал. 1, т. 1, буква "а"

(Предишно Приложение № 3 към чл. 5, т. 1, буква "а", изм. - ДВ, бр. 28 от 2007 г., в сила от 01.04.2007 г.)

Елементите на разследването, посочено в чл. 5, ал. 1, т. 1, буква "а", в зависимост от случая са, както следва:

- а) място на производство, на което:
- се отглеждат или са се отглеждали картофи, които са клоново свързани с картофи, за които е установено заразяване с вредителя,
 - се отглеждат или са се отглеждали домати, които са от един и същ източник с домати, за които е установено заразяване с вредителя,
 - се отглеждат или са се отглеждали картофи или домати, които са поставяни под официален контрол поради съмнение за наличие на вредителя,
 - се отглеждат или са се отглеждали картофи, които са клоново свързани с картофи, които са отглеждани на производствени участъци, за които е установено заразяване с вредителя,
 - се отглеждат картофи или домати и е разположено в близост до заразени места за производство, включително места за производство, които използват общо производствено оборудване и съоръжения пряко или чрез общ изпълнител,
 - се използва повърхностна вода за напояване или дъждуване от източник, за който е потвърдено или има съмнение за заразяване с вредителя,
 - се използва повърхностна вода за напояване или дъждуване от източник, използван съвместно с места за производство, за които е потвърдено или има съмнение за заразяване с вредителя,
 - има или е имало наводнение от повърхностна вода, за която е потвърдено или има съмнение за заразяване с вредителя;
- и
- б) повърхностна вода, която е използвана за напояване или дъждуване на продукцията или е наводнявала полето/полетата или мястото/местата на производство, за която е потвърдено заразяване с вредителя.

Приложение № 5 към чл. 5, ал. 1, т. 1, буква "г"

(Изм. и доп. - ДВ, бр. 71 от 2006 г., предишно Приложение № 4 към чл. 5, т. 1, буква "г", изм. - ДВ, бр. 28 от 2007 г., в сила от 01.04.2007 г.)

1. Елементите, които следва да се вземат предвид при определянето на размера на вероятното заразяване в съответствие с чл. 5, ал. 1, т. 1, буква "г" и чл. 5, ал. 1, т. 3, буква "в", са, както следва:

- изброеният растителен материал, отгледан на място на производство, определен като заразено по чл. 5, ал. 1, т. 1, букви "б" и "в",
- място/места на производство с някаква производствена връзка с изброения растителен материал, определен като заразен в съответствие с чл. 5, ал. 1, т. 1, букви "б" и "в", включително тези, които използват общо производствено оборудване и съоръжения пряко или чрез общ изпълнител,
- изброеният растителен материал, отгледан на място/места на производство,

посочени в предходното тире, или който се е намирал на такова място/места по времето, когато изброеният растителен материал, определен като заразен по чл. 5, ал. 1, т. 1, букви "б" и "в", се е намирал на мястото на производство, посочено в първото тире,

- помещенията за работа с изброения растителен материал от местата за производство, посочени в горните тирета,

- всяка машина, превозно средство, съд, склад или техни елементи и всички други предмети, включително опаковъчен материал, за които има вероятност да са били в контакт с изброения растителен материал, определен като заразен по чл. 5, ал. 1, т. 1, букви "б" и "в",

- всеки от изброения растителен материал, съхраняван във или в контакт със структурите или предметите, изброени в предходното тире, преди тези структури или предмети да бъдат почистени и дезинфекцирани,

- в резултат на разследването и изпитването по чл. 5, ал. 1, т. 1, буква "а", когато става въпрос за картоф - клубените или растенията с дъщерни или родителски клонови връзки, а когато става въпрос за домати - растенията от един и същ източник, с изброения растителен материал, определен като заразен по чл. 5, ал. 1, т. 1, букви "б" и "в", и за които, независимо че може да са получени отрицателни резултати от изпитването за наличие на вредителя, заразяването изглежда възможно чрез клонова връзка; може да се направи сортово изпитване, за да се удостовери идентичността на заразените и клоново свързаните клубени и растения,

- място/места на производство на изброения растителен материал, посочен в предходното тире,

- място/места на производство на изброения растителен материал, за които се използва вода за напояване или дъждуване, определена като заразна по чл. 5, ал. 1, т. 3, буква "б",

- изброен растителен материал, произведен на полета, наводнявани от повърхностна вода, за която е потвърдено, че е заразна.

2. Елементите, които следва да се вземат предвид при определянето на размера на вероятното заразяване в съответствие с чл. 5, ал. 1, т. 1, буква "д" и чл. 5, ал. 1, т. 3, буква "в", са, както следва:

а) в случаите по чл. 5, ал. 1, т. 1, буква "д":

- близост до други места на производство, където се отглежда изброеният растителен материал,

- общо производство и използване на картофи за семе,

- места на производство, за които се използва повърхностна вода за напояване или дъждуване на изброения растителен материал, в случаи, когато има или е имало риск от отток на повърхностни води от място/места на производство или от наводняване на място/места на производство, определени като заразени по чл. 5, ал. 1, т. 1, букви "б" и "в";

б) в случаите, когато повърхностна вода е определена като заразна по чл. 5, ал. 1, т. 3, буква "б":

- място/места на производство, на които се произвежда изброеният растителен материал, които са прилежащи до или под риск от наводняване от повърхностна вода, определена като заразна,

- всеки отделен напоителен басейн, свързан с повърхностна вода, определена като заразна,

- водоемници, свързани с повърхностна вода, определена като заразна, като се

имат предвид:

- посоката и дебитът на водата, определена като заразена,
- наличието на диви растения гостоприемници от семейство Solanaceae.

3. Уведомлението, посочено в чл. 5, ал. 2, се прави, както следва:

- незабавно след като се потвърди наличието на вредителя чрез лабораторно изпитване, в което са използвани методите, дадени в приложение № 2, се предоставя най-малко следното:

- за картофите:

а) име на сорта на партидата,

б) тип (за преработка и консумация, семена и т. н.) и където е приложимо, категория на семената,

- за доматиените растения, име на сорта на партидата и където е приложимо, категорията,

- без да противоречи на изискванията за уведомяване по чл. 4, ал. 2 и 3, при потвърдено наличие и опасност от заразяване на изброения растителен материал, излизащ от или влизащ в друга държава/и членка/и, Националната служба за растителна защита незабавно уведомява заинтересованата/ите държава/и членка/и за информация, необходима за спазване на чл. 5, ал. 3, както следва:

а) име на сорта на партидата от картофи или домати,

б) име и адрес на изпращача и получателя,

в) дата на доставка на партидата от картофи или домати,

г) размер на доставената партидата от картофи или домати,

д) копие на растителния паспорт или поне номер на растителния паспорт в зависимост от случая или където е уместно, регистрационен номер на производителя или търговеца и копие на съобщението за доставка.

Комисията незабавно се уведомява, когато се представи такава информация.

4. Подробните данни от допълнителното уведомление, посочено в чл. 5, ал. 2, се прави, както следва:

След приключване на разследването за всеки случай се предоставя следното:

а) дата на потвърждаване на заразяване,

б) кратко описание на проведеното разследване с цел идентифициране на източника и вероятното разпространение на заразата, включително и нивото на предприетото пробовземане,

в) информация за идентифицирания или предполагаемия източник/ци на заразяване,

г) подробни данни за размера на определеното заразяване, включително и броят на местата на производство и за картофите - броят на партидите с означаване на сорта, а за картофите за посев - на категорията,

д) подробни данни за заразената зона, включително и броят на местата на производство, които не са определени като заразени, но са включени в района,

е) подробни данни за определянето на водата като заразена, включително и името и местоположението на водоема и степента на зараза/забрана за напояване,

ж) за всички пратки с доматиените растения или партиди, определени като заразени, сертификатите, предвидени в чл. 12 от Наредба № 1 за фитосанитарен контрол, и номер на паспорта в съответствие със списъка в приложение № 5, част А, раздел I.2.2 към Наредба № 1 за фитосанитарен контрол,

з) всяка друга информация, която е свързана с потвърдените огнище/а и която

Комисията може да изиска.

Приложение № 6 към чл. 6, ал. 1

(Изм. и доп. - ДВ, бр. 71 от 2006 г., предишно Приложение № 5 към чл. 6, ал. 1, изм. - ДВ, бр. 28 от 2007 г., в сила от 01.04.2007 г.)

1. С цел премахване на риска от разпространение на заразата се прилага една от следните мерки:

- употреба като храна за животни след топлинна обработка, при която няма риск от оцеляване на вредителя,

или

- депониране на официално одобрено за целта място, за което не е установен риск от изпускане на вредителя в околната среда примерно чрез просмукване в селскостопански земи или влизане в контакт с водоизточници, които могат да се използват за напояване на селскостопански земи,

или

- изгаряне,

или

- промишлено преработване чрез директно и незабавно доставяне в преработвателно предприятие с официално одобрени съоръжения за депониране на отпадъците, за които не е установен риск от разпространение на вредителя, и със система за почистване и дезинфекция поне на превозните средства, напускащи обекта,

или

- други мерки, при условие че не е установен риск от разпространение на вредителя; Националната служба за растителна защита уведомява Комисията и другите държави членки за такива мерки и основанията за прилагането им.

Всички останали отпадъци, свързани със и възникнали от възможностите, посочени по-горе, се депонират съгласно официално одобрени методи в съответствие с приложение № 7 на тази наредба.

2. Подходящата употреба или депониране на изброения растителен материал, посочен в чл. 6, ал. 2 и чл. 4, ал. 1, се извършва под контрола на Националната служба за растителна защита в сътрудничество с други отговорни официални органи с цел осигуряване на контрол и одобряване пакетирането или преработването на картофите при следните условия:

а) за картофени клубени:

- употреба като картофи за консумация, опаковани за директна доставка и употреба без повторно опаковане, в места с подходящи съоръжения за депониране на отпадъци; картофите, предназначени за засаждане, могат да се обработват в същия обект само ако това става отделно или след почистване и дезинфекция,

или

- употреба като картофи за промишлено преработване и предназначени за директно и незабавно доставяне в преработвателно предприятие с подходящи съоръжения за депониране на отпадъци и със система за почистване и дезинфекция поне на превозните средства, напускащи обекта,

или

- друга употреба или депониране, при условие че за тях е определено, че не е установен риск от разпространение на вредителя, и след одобрение от страна на упоменатите отговорни официални органи;

б) за други части на растенията, включително стеблото и остатъци от листната част:

- унищожаване,

или

- друга употреба или депониране, при условие че за тях е определено, че не е установен риск от разпространение на вредителя, и след одобрение от страна на упоменатите отговорни официални органи.

3. Подходящите методи за обеззаразяване на предметите, посочени в чл. 6, ал. 3, са почистване и в зависимост от случая - дезинфекция, извършвани под надзора на фитосанитарните инспектори, така че да не се допуска риск от разпространение на вредителя.

4. В заразената зона, определена съгласно чл. 5, ал. 1, т. 1, буква "д" и т. 2, букви "а" и "б" и т. 3, буква "в", и чл. 6, ал. 4, се предприемат следните мерки: 4.1. Когато места на производство са определени като заразени в съответствие с чл. 5, ал. 1, т. 1, букви "б" и "в":

а) в поле или единица за производство на защитени култури, определени като заразени в съответствие с чл. 5, ал. 1, т. 1, букви "б" и "в",

или

аа) през поне четири вегетационни сезона след годината, когато е определено заразяването:

- се предприемат мерки за премахване на самосевките от картофени и домати растения, както и на други растения гостоприемници на вредителя, включително и плевели от семейство Solanaceae,

- и не се засаждат:

- картофени клубени, растения или същински семена,

- домати растения и семена,

- като се има предвид биологията на вредителя, други растения гостоприемници,

- растения от семейство Brassicaceae, за които има установен риск от оцеляване на вредителя,

- растения, за които има установен риск от разпространение на вредителя;

- през първия сезон на прибиране на реколтата от картофи или домати след периода, определен в т. аа), и при условие че е установено, че в полето няма самосевки от картофени и домати растения, както и други растения гостоприемници на вредителя, включително и плевели от семейство Solanaceae, по време на официални проверки на място през поне две последователни вегетативни години преди засаждане:

- за картофите се разрешава само производството на картофи за преработка и консумация,

- за картофите и доматите по целесъобразност се извършва изпитване на прибраните картофени клубени или на домати растения в съответствие с процедурата, описана подробно в приложение № 2;

- през сезона на прибиране на картофите или домати, последващ упоменатия в предходното тире, и след подходящ цикъл на ротация, който трябва да е най-малко две

години, когато ще се отглеждат картофи за семе, се извършва официално изследване, подробно разгледано в чл. 2, ал. 1 и 2;

или

аб) през поне пет вегетационни сезона след годината, когато е определено заразяването:

- се предприемат мерки за премахване на самосевките на картофени и домати растения, както и на други растения гостоприемници на вредителя, включително и плевели от семейство Solanaceae,

и

- полето се установява и поддържа през първите три години като необработена угар или засято със зърнени култури в зависимост от установения риск или като постоянно пасище с честа ниска коситба или интензивно пасище, или като трева за семепроизводство, а през следващите две години се засажда растения, които не са гостоприемници на вредителя, за които не е установен риск от оцеляване или разпространение на вредителя,

- през първия сезон на прибиране на картофите или домати, последващ упоменатия в предходното тире период, и при условие че е установено, че в полето няма самосевки от картофени и домати растения, както и други растения гостоприемници на вредителя, включително и плевели от семейство Solanaceae, по време на официални проверки най-малко през два последователни вегетационни сезона преди засаждане:

- за картофите се разрешава производството на картофи за семе и за преработка и консумация,

- за прибраните картофени клубени или на домати растения се изисква изследване в зависимост от случая в съответствие с процедурата, описана подробно в приложение № 2;

б) във всички други полета в заразеното място на производство и при условие че фитосанитарните инспектори установят, че рискът от самосевки на картофени растения и домати растения, както и други естествено срещащи се растения гостоприемници на вредителя, включително и плевели от семейство Solanaceae в зависимост от случая, е елиминиран:

- през вегетационния сезон след годината, когато е определено заразяването,

- не се засажда картофени клубени, растения и същински семена, както и други растения гостоприемници на вредителя,

или

- за картофените клубени е разрешено засаждането на сертифицирани картофи за семе само за производство на картофи за преработка и консумация,

- за домати растения е разрешено отглеждането на домати растения от семе, което отговаря на изискванията на Наредба № 1 за фитосанитарен контрол, само за производство на плодове;

- през втория вегетационен сезон след годината, когато е определено заразяването:

- за картофите се разрешава само засаждане на сертифицирани картофи за семе или картофи за семе, официално изпитани за отсъствие на бактериално кафяво гниене и отгледани под официален контрол на места на производство, различни от посочените в т. 4.1, за производството на семена или на картофи за консумация и преработка,

- за домати се разрешава само засаждане на домати растения, отгледани от семе, което отговаря на изискванията на Наредба № 1 за фитосанитарен контрол, или в

случай на вегетативно размножаване - от домати растения, произведени от такова семе и отгледани под официален контрол на места на производство, различни от посочените в т. 4.1, за производството на семена или плодове;

- през третия вегетационен сезон след годината, когато е определено заразяването:

- за картофите се разрешава само засаждане на сертифицирани картофи за семе или картофи за семе, отгледани под официален контрол от сертифицирани картофи за семе за производството на семена или на картофи за преработка и консумация,

- за домите се разрешава само засаждане на домати растения, отгледани от семе, което отговаря на изискванията на Наредба №1 за фитосанитарен контрол, или от домати растения, отгледани под официален контрол от такива растения, за производството на растения или плодове;

- през всеки от вегетационните сезони, посочени в предходните тирета, се предприемат мерки за премахване на самосевките на картофени растения, както и други естествено срещащи се растения гостоприемници на вредителя, ако има такива, и се извършват официални проверки на отглежданата култура на всяко поле през подходящи периоди, като се провежда и официалното изпитване на прибраните картофи в съответствие с процедурата, разгледана подробно в приложение № 2;

в) незабавно след определяне на заразяването в съответствие с чл. 5, ал. 1, т. 1 , букви "б" и "в" и след първата последваща вегетационна година:

- всички машини и складови помещения на мястото на производство и включените в производството на картофи или домати се почистват, а в зависимост от случая - и дезинфекцират с помощта на подходящи методи, определени в т. 3,

- въвеждат се официални контролни мерки за програмите за напояване и дъждуване, включително и тяхното забраняване, в зависимост от случая, за да се предотврати разпространението на вредителя;

г) в производствена единица за защитени култури, определена като заразена в съответствие с чл. 5, ал. 1, т. 1 , букви "б" и "в", където е възможна пълна подмяна на растителната среда:

- не се засажда картофени клубени, растения или същински семена или други растения гостоприемници на вредителя, включително домати растения и семена, докато производствената единица не се подложи на официално контролирани мерки за премахване на вредителя и за отстраняване на целия растителен материал от гостоприемника, включително най-малко пълна смяна на растителната среда и почистване, а в зависимост от случая - и дезинфектиране на посочената единица и цялото оборудване, и не се получи писмено одобрение от Националната служба за растителна защита за производство на картофи и домати,

и

- производството на картофи е от сертифицирани картофи за семе или от миниклубени или микрорастения, получени от изпитани източници,

- производството на домати е от семе, което отговаря на изискванията на Наредба № 1 за фитосанитарен контрол или при вегетативно размножаване - от домати растения, получени от такива семена и отгледани под официален контрол,

- въвеждат се официални контролни мерки за програмите за напояване и дъждуване, включително и тяхното забраняване, в зависимост от случая, за да се предотврати пренасянето на вредителя.

4.2. В рамките на зоната на зараза, без да противоречи на мерките, определени в

т. 4.1:

а) незабавно след определяне на заразяването всички машини и складови помещения на мястото на производство и включените в производството на картофи или домати се почистват, а при необходимост - и дезинфекцират съгласно методи, определени в т. 3;

б) незабавно и най-малко за три вегетационни сезона след определяне на заразяването:

(ба) в случаите, когато зоната на зараза е определена в съответствие с чл. 5, ал. 1, т. 1, букви "д", т. 2, букви "а" и "б":

- фитосанитарните инспектори осъществяват надзор върху помещенията за отглеждане, съхраняване и обработване на картофени клубени или домати заедно с помещенията, където се намират машините за производство на картофи или домати по договор,

- засаждат се само сертифицирани семена или семена, отгледани под официален контрол за всички картофени реколти в рамките на зоната, както и изпитване след прибиране на продукцията от картофи за семе, отгледани на места на производство, определени като вероятно заразени в съответствие с чл. 5, ал. 1, т. 1, буква "г" ,

- прибраната продукция от картофи за семе се обработва отделно от тази за картофи за преработка и консумация във всички помещения в рамките на зоната или се прилага система за почистване, а при необходимост - и дезинфекция, между обработването на семената - и продукцията от картофи за преработка и консумация,

- засаждат се само домати растения, отгледани от семе, което отговаря на изискванията на Наредба № 1 за фитосанитарен контрол, или при вегетативно размножаване - от домати растения, получени от такова семе и отгледани под официален контрол, за цялата домати реколта в рамките на зоната,

- провежда се официално изследване съгласно чл. 2, ал. 1 и 2;

(бб) в случаите, когато повърхностна вода е определена като заразена в съответствие с чл. 5, чл. 1, т. 3, буква "б" или включена в елементите за възможно предаване на вредителя в съответствие с т. 2 от приложение № 5, фитосанитарните инспектори извършват:

- годишно обследване през подходящи периоди, включително и пробовземане от повърхностни води, а в зависимост от случая - и от растения гостоприемници от семейство Solanaceae, в съответните водни източници, в съответствие с методите, предвидени в приложение № 2 за изброения растителен материал и за други случаи,

- официален контрол върху програмите за напояване и дъждуване, включително и забрана за използване на вода, определена като заразена, за напояване и дъждуване на изброения растителен материал, а в зависимост от случая - и на други растения гостоприемници, с цел предотвратяване разпространението на вредителя; забраната може да се преразгледа на основата на резултатите, получени от упоменатото годишно обследване, и да се отмени определената зараза, когато отговорните официални органи са убедени, че повърхностната вода вече не е заразена; може да се разреши ползването на вода, за която има забрана, за напояване и дъждуване на растения гостоприемници, когато е под официален контрол и когато се използват официално одобрени техники за премахване на вредителя и предотвратяване на разпространението му, - в случаите на заразени течни отпадъци контрол върху депонирането на твърди и течни отпадъци от обекти за промишлено преработване или за опаковане, които работят с изброения растителен материал;

в) по целесъобразност се изготвя програма за подмяната на всички запаси от картофи за семе за определен период от време.

Приложение № 7 към чл. 6, ал. 1

(Ново - ДВ, бр. 28 от 2007 г., в сила от 01.04.2007 г.)

Официално одобрените методи за депониране на отпадъци, посочени в приложение № 7, т. 1, трябва да съответстват на следните изисквания, които при всеки установен риск от разпространяване на вредителя отстраняват този риск:

а) картофени или домати отпадъци (включително шкартирани картофи и обелки, както и домати) и всички други твърди отпадъци, свързани с картофите и домати (включително почва, камъни и други парчета) се депонират чрез:

- депониране на официално одобрено за целта място, за което не е установен риск от изпускане на вредителя в околната среда примерно чрез просмукване в селскостопански земи или влизане в контакт с водоизточници, които могат да се използват за напояване на селскостопански земи; отпадъците се извозват директно до сметището при контролирани условия, които не създават риск от загуба на отпадъците,

или

- изгаряне,

или

- други мерки, при условие че не е установен риск от разпространение на вредителя, за които мерки Националната служба за растителна защита уведомява Комисията и другите държави членки;

б) течни отпадъци: преди депониране течните отпадъци, които съдържат неразтворени твърди субстанции, се подлагат на филтриране или утаяване и последващо депониране на филтратата/утайката, както е предвидено в буква "а", и след това течните отпадъци:

- преди депонирането се загряват най-малко до 60°C през цялото количество в продължение на минимум 30 минути,

или

- се депонират по друг официално одобрен и официално контролиран начин, за който не е установен риск от влизане в контакт на отпадъка със селскостопански земи или с водоизточници, които могат да се използват за напояване на селскостопански земи; Националната служба за растителна защита уведомява подробно другите държави членки и Комисията за него.

Възможните варианти, описани в настоящото приложение, се прилагат и за отпадъците, свързани с обработката, депонирането и преработката на заразени партии.