Αριθμός 355

ΟΙ ΠΕΡΙ ΜΕΤΡΩΝ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΚΑΤΑ ΤΗΣ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΕΞΑΠΛΩΣΗΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΕΠΙΒΛΑΒΩΝ ΓΙΑ ΤΑ ΦΥΤΑ ΚΑΙ ΤΑ ΦΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΝΟΜΟΙ ΤΟΥ 2003 ΚΑΙ 2005

Διάταγμα δυνάμει του άρθρου 24(2)(α)

Για σκοπούς εναρμόνισης με την πράξη της Ευρωπαϊκής Κοινότητας με τίτλο—

Επίσημη Εφημερίδα της Ε.Ε.: L 182 4.7.2006 σ. 1.

«Οδηγία 2006/56/ΕΚ της Επιτροπής, της 12ης Ιουνίου 2006, για την τροποποίηση των παραρτημάτων της Οδηγίας 93/85/ΕΟΚ του Συμβουλίου για την καταπολέμηση της δακτυλιωτής σήψης (ring rot) της πατάτας»,

Ο Υπουργός Γεωργίας, Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος ασκώντας τις εξουσίες που του παρέχει το άρθρο 24(2)(α) των περί Μέτρων Προστασίας κατά της Εισαγωγής και Εξάπλωσης Οργανισμών Επιβλαβών για τα Φυτά και τα Φυτικά Προϊόντα Νόμων του 2003 και 2005, εκδίδει το ακόλουθο Διάταγμα.

Συνοπτικός τίτλος.

1. Το παρόν Διάταγμα θα αναφέρεται ως το περί Μέτρων Προστασίας κατά της Εισαγωγής και Εξάπλωσης Οργανισμών Επιβλαβών για τα Φυτά και τα Φυτικά Προϊόντα (Μέτρα για την Καταπολέμηση της Δακτυλιωτής Σήψης της Πατάτας) Πρώτο Διάταγμα του 2006.

Ερμηνεία.

2. Στο παρόν Διάταγμα—

Επίσημη Εφημερίδα, Παράρτημα Τρίτο (Ι): 3.10.2003.

«Κανονισμοί» σημαίνει τους περί Μέτρων Προστασίας κατά της Εισαγωγής και Εξάπλωσης Οργανισμών Επιβλαβών για τα Φυτά και τα Φυτικά Προϊόντα (Μέτρα για την Καταπολέμηση της Κορυνοβακτηρίωσης της Πατάτας) Κανονισμούς του 2003.

147(Ι) του 2003 93(Ι) του 2005.

«Νόμος» σημαίνει τους περί Μέτρων Προστασίας κατά της Εισαγωγής και Εξάπλωσης Οργανισμών Επιβλαβών για τα Φυτά και τα Φυτικά Προϊόντα Νόμους του 2003 και 2005.

«Δακτυλιωτή σήψη» σημαίνει τον επιβλαβή οργανισμό Clavibacter michiganensis (Smith) Davis et al. ssp. sepedonicus (Spieckermann και Kotthoff) Davis et al. παθογόνο αίτιο που προκαλεί τη δακτυλιωτή σήψη της πατάτας.

Αντικατάσταση Παραρτημάτων Ι, ΙΙ, ΙΙΙ και IV των Κανονισμών.

3. Τα Παραρτήματα Ι, ΙΙ, ΙΙΙ και IV των Κανονισμών αντικαθίστανται από τα αντίστοιχα κείμενα που περιλαμβάνονται στα Παραρτήματα Ι, ΙΙ, ΙΙΙ και IV, αντίστοιχα, του παρόντος Διατάγματος.

Έναρξη ισχύος.

4. Το παρόν Διάταγμα τίθεται σε ισχύ από την 1η Απριλίου 2007.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι
(άρθρο 3)

ΣΧΗΜΑ ΔΟΚΙΜΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ, ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ ΤΗΣ ΔΑΚΤΥΛΙΩΤΗΣ ΣΗΨΗΣ, *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* (Smith) Davis *et al.* ssp. *SEPEDONICUS* (Spieckermann et Kotthoff) Davis *et al.*

ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΟΥ ΣΧΗΜΑΤΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ

Το σχέδιο που παρουσιάζεται περιγράφει τις διάφορες διαδικασίες για:

(i) Τη διάγνωση της δακτυλιωτής σήψης σε κονδύλους και φυτά πατάτας·

(ii) την ανίχνευση του *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* σε δείγματα κονδύλων και φυτών πατάτας·

(iii) την ταυτοποίηση του *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*C. m.* subsp. *sepedonicus*).

ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ

Στα προσαρτήματα παρέχονται βελτιωμένα πρωτόκολλα σχετικά με τις διάφορες μεθόδους, επικυρωμένα αντιδραστήρια και λεπτομέρειες σχετικά με την προετοιμασία των υλικών δοκιμής και μαρτύρων. Στο προσάρτημα 1 παρατίθεται κατάλογος των εργαστηρίων που συμμετείχαν στη βελτιστοποίηση και επικύρωση των πρωτοκόλλων.

Λόγω του ότι τα πρωτόκολλα αφορούν την ανίχνευση ενός οργανισμού καραντίνας και περιλαμβάνουν τη χρήση βιώσιμων καλλιεργειών του *C. m.* subsp. *sepedonicus* ως υλικών μαρτύρων, είναι απαραίτητο να εφαρμοσθούν οι διαδικασίες υπό τις κατάλληλες συνθήκες καραντίνας, με επαρκείς εγκαταστάσεις διάθεσης αποβλήτων και υπό την προϋπόθεση προηγούμενης χορήγησης των κατάλληλων αδειών από τις επίσημες αρχές που είναι υπεύθυνες για θέματα καραντίνας φυτών.

Οι παράμετροι που καθορίζουν τη διεξαγωγή των δοκιμών πρέπει να εξασφαλίζουν σταθερή και αναπαραγώγιμη ανίχνευση των επιπέδων του *C. m.* subsp. *sepedonicus* στα καθορισθέντα όρια των επιλεγμένων μεθόδων.

Η ακριβής παρασκευή των θετικών μαρτύρων είναι επιτακτική.

Η διενέργεια δοκιμών σύμφωνα με τα απαιτούμενα όρια προϋποθέτει επίσης την εξασφάλιση ορθών παραμέτρων, συντήρηση και βαθμονόμηση του εξοπλισμού, την προσεκτική μεταχείριση και συντήρηση των αντιδραστηρίων καθώς και τη λήψη όλων των απαραίτητων μέτρων για την αποφυγή μόλυνσης μεταξύ των δειγμάτων, π.χ. το διαχωρισμό των θετικών μαρτύρων από τα ελεγχόμενα δείγματα. Είναι απαραίτητο να εφαρμόζονται πρότυπα ελέγχου της ποιότητας έτσι ώστε να αποφευχθούν διοικητικά και άλλα σφάλματα, ιδιαίτερα όσον αφορά την επισήμανση και την τεκμηρίωση.

Η πιθανολογούμενη εμφάνιση του παθογόνου, όπως αυτή αναφέρεται στην παράγραφο (2) του Κανονισμού 6, σημαίνει την ύπαρξη θετικού αποτελέσματος των διαγνωστικών δοκιμών ή των δοκιμών διαλογής που διενεργήθηκαν επί δειγμάτων,
όπως ορίζεται στα διαγράμματα ροής.

Εάν η πρώτη δοκιμή διαλογής (IF ή PCR/FISH) είναι θετική, η μόλυνση από το Cms θεωρείται πιθανή και πρέπει να πραγματοποιηθεί δεύτερη δοκιμή διαλογής. Εάν και η δεύτερη δοκιμή διαλογής είναι θετική, η υποψία μόλυνσης επιβεβαιώνεται (πιθανολογούμενη εμφάνιση του παθογόνου) και πρέπει να συνεχισθεί η πραγματοποίηση δοκιμών σύμφωνα με το σχήμα. Εάν η δεύτερη δοκιμή διαλογής είναι αρνητική, τότε θεωρείται ότι το δείγμα δεν έχει μολυνθεί από το Cms.

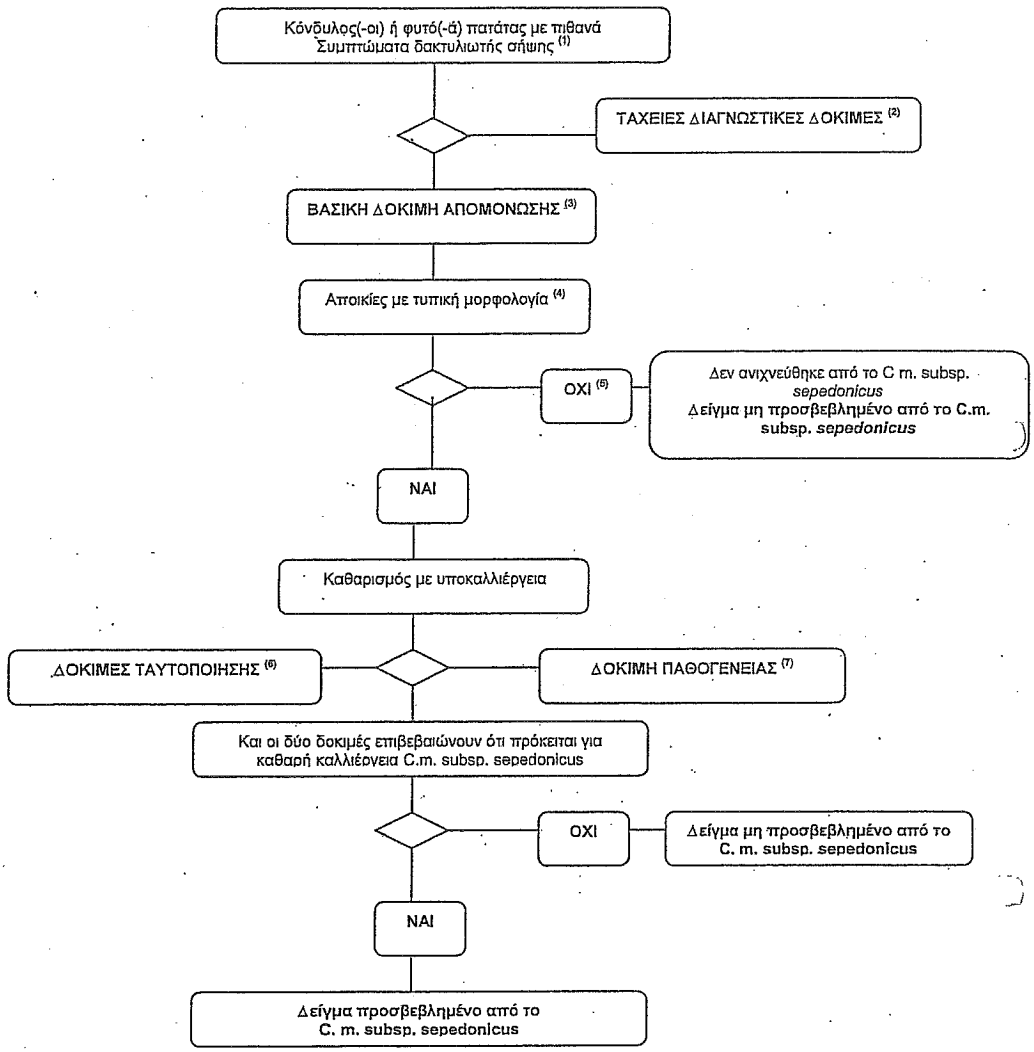
Για το λόγο αυτό, ως θετικό αποτέλεσμα της δοκιμής IF, όπως αναφέρεται στην παράγραφο (2) του Κανονισμού 6, χαρακτηρίζεται η θετική ανάγνωση IF που έχει επιβεβαιωθεί από δεύτερη δοκιμή διαλογής (PCR/FISH).

Η επιβεβαίωση της παρουσίας του οργανισμού, όπως αναφέρεται στην παράγραφο (1) του Κανονισμού 7, σημαίνει την απομόνωση και ταυτοποίηση καθαρής καλλιέργειας του *C. m.* subsp. *sepedonicus* και επιβεβαίωση της παθογένειας.

1. ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΟΥ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΡΟΗΣ

1.1. Σχήμα ανίχνευσης για τη διάγνωση της δακτυλιωτής σήψης σε κονδύλους πατάτας και φυτά πατάτας που παρουσιάζουν συμπτώματα δακτυλιωτής σήψης

Η διαδικασία εξέτασης προορίζεται για κονδύλους και φυτά πατάτας που παρουσιάζουν συμπτώματα τυπικά ή που γεννούν υπόνοιες για ύπαρξη δακτυλιωτής σήψης. Η διαδικασία περιλαμβάνει μία δοκιμή ταχείας διαλογής, απομόνωση του παθογόνου αιτίου από μολυσμένο αγγειώδη ιστό σε διαγνωστικά υλικά και, σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος, ταυτοποίηση της καλλιέργειας ως *C. m.* subsp. *sepedonicus*.



---

(1) Περιγραφή των συμπτωμάτων παρατίθεται στην ενότητα 2

(2) Οι κατάλληλες δοκιμές είναι:
- δοκιμή IF (ενότητα 4)
- δοκιμή PCR (ενότητα 6)
- δοκιμή FISH (ενότητα 5)

(3) Αν και η απομόνωση του παθογόνου αιτίου με τη διαδικασία διαδοχικών αραιώσεων επί στερεού υποστρώματος από ιστούς με τυπικά συμπτώματα είναι άμεση, η καλλιέργεια μπορεί να αποτύχει αν βρισκόμαστε σε προχωρημένα στάδια μόλυνσης. Σαπροφυτικά βακτήρια που αναπτύσσονται σε προσβεβλημένο ιστό μπορεί να επικαλύψουν ή να εμποδίσουν την ανάπτυξη του παθογόνου στο υλικό απομόνωσης. Για το λόγο αυτό, συνιστάται η χρήση τόσο μη εκλεκτικών όσον και εκλεκτικών υποστρωμάτων, κατά προτίμηση το MTNA (ενότητα 8) ή της βιοδοκιμής (ενότητα 7).

(4) Η περιγραφή της τυπικής μορφολογίας των αποικιών παρατίθεται στην ενότητα 8.

(5) Στην περίπτωση που το αποτέλεσμα της δοκιμής απομόνωσης είναι αρνητικό αλλά παρουσιάζονται τα τυπικά συμπτώματα της ασθένειας, πρέπει να επαναληφθεί η απομόνωση.

(5) Η αξιόπιστη ταυτοποίηση καθαρής καλλιέργειας του C. m. subsp. sepedonicus επιτυγχάνεται με τη χρήση δοκιμών που αναφέρονται στην ενότητα 9.

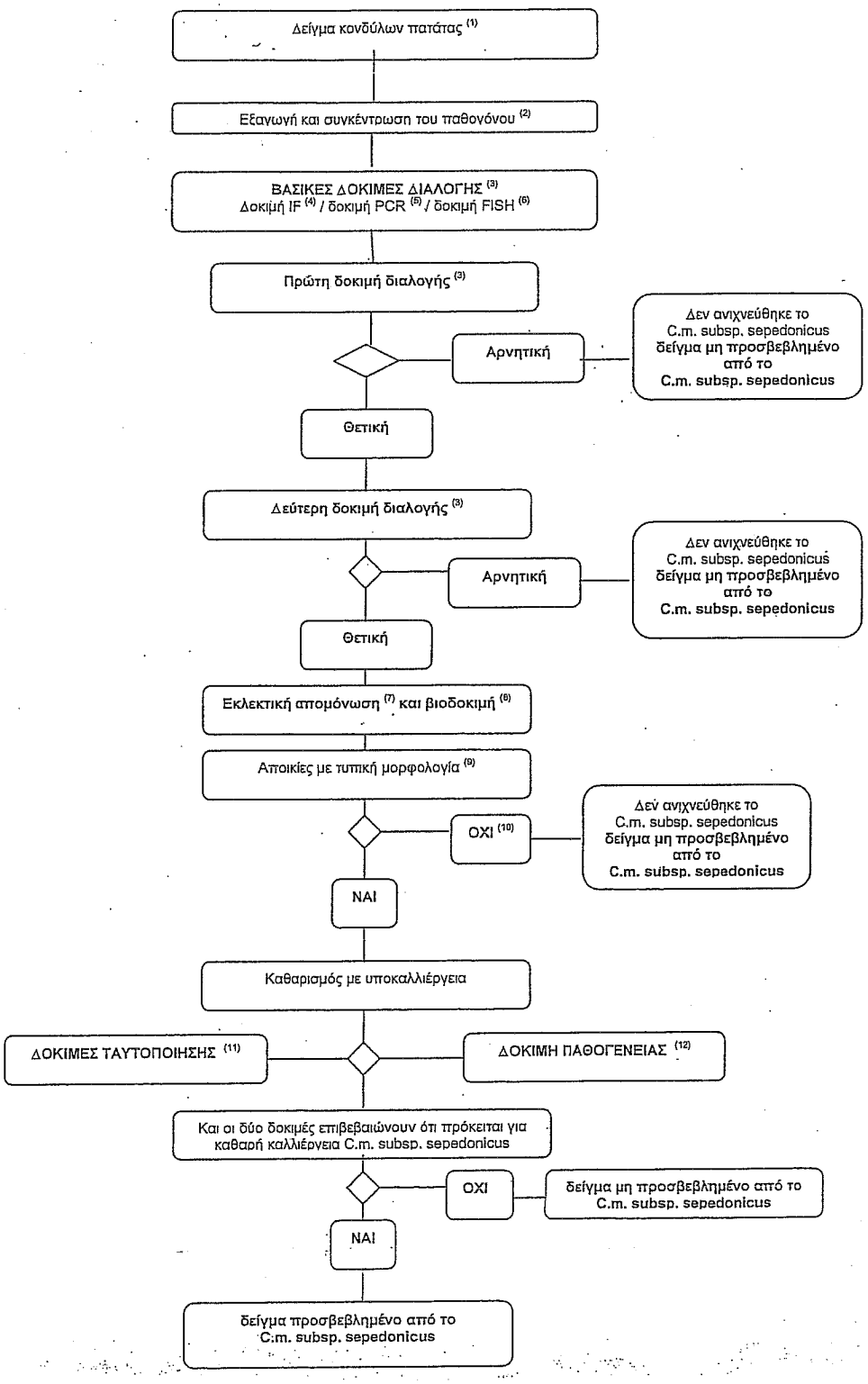
(6) Η δοκιμή παθογένειας περιγράφεται στην ενότητα 10.

1.2. **Σχήμα για την ανίχνευση και ταυτοποίηση του *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* σε δείγματα ασυμπτωματικών κονδύλων πατάτας**

Αρχή

Η διαδικασία εξέτασης αποσκοπεί στην ανίχνευση μολύνσεων σε λανθάνουσα μορφή σε κονδύλους πατάτας. Το θετικό αποτέλεσμα τουλάχιστον δύο δοκιμών διαλογής που βασίζεται σε διαφορετικές βιολογικές αρχές, πρέπει να συμπληρώνεται με την απομόνωση του παθογόνου· ακολουθεί δε, στην περίπτωση απομόνωσης τυπικών αποικιών, επιβεβαίωση μιας καθαρής καλλιέργειας ως καλλιέργειας *C. m.* subsp. *sepedonicus*. Το θετικό αποτέλεσμα μίας μόνον δοκιμής διαλογής δεν επαρκεί για να θεωρηθεί ότι το δείγμα γεννά υπόνοιες.

Οι δοκιμές διαλογής και οι δοκιμές απομόνωσης πρέπει να επιτρέπουν όριο ανίχνευσης της τάξης των 10^3 έως 10^4 κυττάρων/ml αιωρήματος του ιζήματος, συμπεριλαμβανομένων ως θετικών μαρτύρων σε κάθε σειρά δοκιμών.


Δείγμα κονδύλων πατάτας (1)
Εξαγωγή και συγκέντρωση του παθογόνου (2)
ΒΑΣΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ (3)
Δοκιμή IF (4) / δοκιμή PCR (5) / δοκιμή FISH (6)
Πρώτη δοκιμή διαλογής (3)
Αρνητική
Δεν ανιχνεύθηκε το C.m. subsp. sepedonicus δείγμα μη προσβεβλημένο από το C.m. subsp. sepedonicus
Θετική
Δεύτερη δοκιμή διαλογής (3)
Αρνητική
Δεν ανιχνεύθηκε το C.m. subsp. sepedonicus δείγμα μη προσβεβλημένο από το C.m. subsp. sepedonicus
Θετική
Εκλεκτική απομόνωση (7) και βιοδοκιμή (8)
Αποικίες με τυπική μορφολογία (9)
ΟΧΙ (10)
Δεν ανιχνεύθηκε το C.m. subsp. sepedonicus δείγμα μη προσβεβλημένο από το C.m. subsp. sepedonicus
ΝΑΙ
Καθαρισμός με υποκαλλιέργεια
ΔΟΚΙΜΕΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ (11)
ΔΟΚΙΜΗ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ (12)
Και οι δύο δοκιμές επιβεβαιώνουν ότι πρόκειται για καθαρή καλλιέργεια C.m. subsp. sepedonicus
ΟΧΙ
δείγμα μη προσβεβλημένο από το C.m. subsp. sepedonicus
ΝΑΙ
δείγμα προσβεβλημένο από το C.m. subsp. sepedonicus

(1) Το πρότυπο μέγεθος του δείγματος είναι 200 κόνδυλοι αν και η διαδικασία είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί με μικρότερα δείγματα εάν δεν υπάρχουν διαθέσιμοι κόνδυλοι

(2) Οι μέθοδοι εξαγωγής και συγκέντρωσης του παθογόνου περιγράφονται στην ενότητα 3.1

(3) Στην περίπτωση που δύο τουλάχιστον δοκιμές με βάση διαφορετικές βιολογικές αρχές είναι θετικές, πρέπει να διεξαχθεί απομόνωση και επιβεβαίωση. Πραγματοποιείται τουλάχιστον μια δοκιμή διαλογής. Στην περίπτωση που η εν λόγω δοκιμή είναι αρνητική, το δείγμα θεωρείται αρνητικό. Στην περίπτωση που η εν λόγω δοκιμή είναι θετική, απαιτείται η διενέργεια δεύτερης ή περισσοτέρων δοκιμών διαλογής με βάση διαφορετικές βιολογικές αρχές έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί το πρώτο θετικό αποτέλεσμα. Εάν η δεύτερη ή οι άλλες δοκιμές είναι αρνητικές, το δείγμα θεωρείται αρνητικό. Δεν είναι απαραίτητη η διενέργεια περαιτέρω δοκιμών.

(4) Δοκιμή ανοσοφθορισμού (IF)

Για τη δοκιμή διαλογής IF πρέπει να χρησιμοποιείται πάντοτε ένα πολυκλωνικό αντίσωμά. Η χρήση πρόσθετων μονοκλωνικών αντισωμάτων είναι δυνατόν να παρέχει μεγαλύτερη εξειδίκευση (βλέπε ενότητα 4).

(5) Δοκιμή PCR

Πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλως επικυρωμένα αντιδραστήρια και πρωτόκολλα PCR (βλέπε ενότητα 6)

(6) Δοκιμή FISH

Πρέπει να χρησιμοποιούνται επικυρωμένα αντιδραστήρια και πρωτόκολλα (βλέπε ενότητα 5)

(7) Εκλεκτική απομόνωση

Εάν χρησιμοποιείται το υπόστρωμα MTNA ή το υπόστρωμα NCP-88 και 1/100 αραίωση του αιωρήματος του ιζήματος, η μέθοδος αυτή ενδείκνυται σε πολλές περιπτώσεις για την άμεση απομόνωση του C. m. subsp. *sepedonicus* . Οι τυπικές αποικίες είναι δυνατόν να αποκτηθούν 3-10 ημέρες μετά την απομόνωση επί στερεού υποστρώματος. Τότε το παθογόνο αίτιο είναι δυνατόν να καθαρισθεί και να ταυτοποιηθεί. Για την πλήρη αξιοποίηση των δυνατοτήτων της δοκιμής, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η προσεκτική προετοιμασία των κώνων που λαμβάνονται από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου για την αποφυγή δευτερογενών βακτηρίων που έχουν σχέση με τον κόνδυλο της πατάτας που είναι ανταγωνιστές του C. m. subsp. *sepedonicus* στο θρεπτικό υπόστρωμα και μπορούν να καλύπτουν την ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού. Εάν αποτύχει η εν λόγω δοκιμή, πρέπει να γίνει απομόνωση από φυτά που χρησιμοποιούνται για τη βιολογική δοκιμή (βλέπε ενότητα 8)

(8) Η βιοδοκιμή χρησιμοποιείται για την απομόνωση του C. m. subsp. *sepedonicus* από ιζήματα εκχυλισμάτων πατάτας κατόπιν εκλεκτικού εμπλουτισμού σε φυτά μελιντζάνας (*Solanum melongena*). Η δοκιμή απαιτεί άριστες συνθήκες επώασης όπως έχουν προδιαγραφεί για τη μέθοδο αυτή. Τυχόν βακτήρια που δρουν παρεμποδιστικά έναντι του C. m. subsp. *sepedonicus* στο υπόστρωμα MTNA ή NCP -88, κατά πάσα πιθανότητα, δεν δρουν παρεμβατικά στη δοκιμή αυτή (βλέπε ενότητα 7)

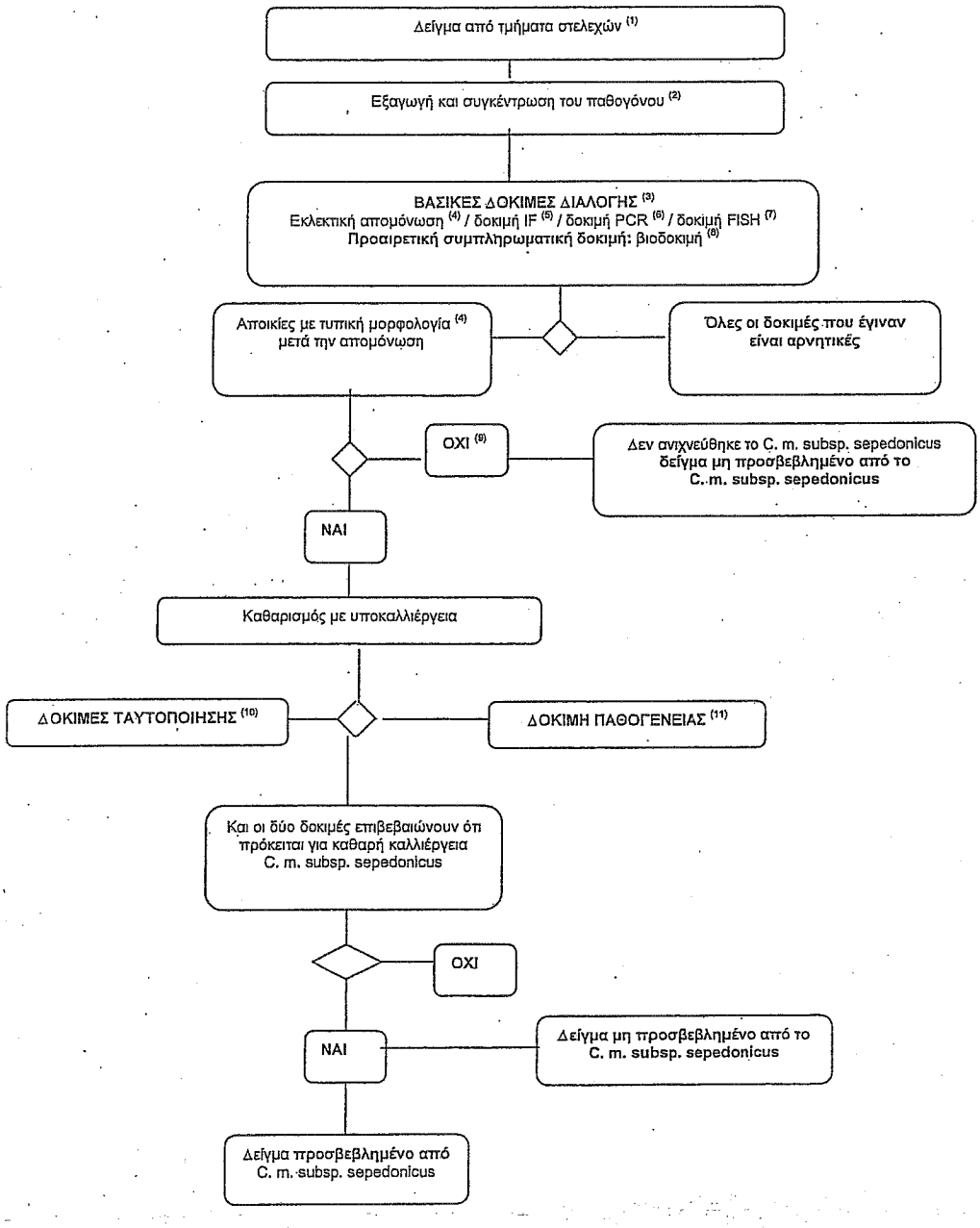
(9) Η τυπική μορφολογία των αποικιών περιγράφεται στην ενότητα 8.

(10) Η καλλιέργεια ή οι βιοδοκιμές είναι δυνατόν να αποτύχουν λόγω ανταγωνισμού ή παρεμπόδισης από σαπροφυτικά βακτήρια. Εάν αποκτηθούν θετικά αποτελέσματα στις δοκιμές διαλογής, αλλά τα αποτελέσματα των δοκιμών απομόνωσης είναι αρνητικά, πρέπει να επαναληφθούν οι δοκιμές απομόνωσης από το ίδιο ίζημα ή με τη λήψη πρόσθετου αγγειώδους ιστού κοντά στο σημείο πρόσφυσης του στολονίου από κομμένους κονδύλους του ιδίου δείγματος και, εάν είναι απαραίτητο, να ελεχθούν πρόσθετα δείγματα.

(11) Η αξιόπιστή ταυτοποίηση καθαρής καλλιέργειας του C. m. subsp. *sepedonicus* επιτυγχάνεται με τη χρήση των δοκιμών που αναφέρονται στην ενότητα 9.

(12) Η δοκιμή παθογένειας περιγράφεται στην ενότητα 10.

1.3 Σχήμα για την ανίχνευση και ταυτοποίηση του *Clavibacter michiganensis* ssp *sepedonicus* σε δείγματα ασυμπτωματικών φυτών πατάτας



(1) Βλέπε ενότητα 3.2 για τα συνιστώμενα μεγέθη δειγμάτων
(2) Οι μέθοδοι εξαγωγής και συγκέτρωσης του παθογόνου περιγράφονται στην ενότητα 3.2
(3) Στην περίπτωση που δύο τουλάχιστο δοκιμές με βάση διαφορετικές βιολογικές αρχές είναι θετικές, πρέπει να διεξαχθεί απομόνωση και επιβεβαίωση.
Πρέπει να πραγματοποιηθεί τουλάχιστο μια δοκιμή διαλογής. Εάν το αποτέλεσμα της δοκιμής αυτής είναι αρνητικό, το δείγμα θεωρείται αρνητικό. Εάν το αποτέλεσμα της εν λόγω δοκιμής είναι θετικό, απαιτείται η διενέργεια δεύτερης ή περισσοτέρων δοκιμών διαλογής με βάση διαφορετικές βιολογικές αρχές έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί το αρχικό θετικό αποτέλεσμα. Εάν η δεύτερη ή άλλες δοκιμές είναι αρνητικές, το δείγμα θεωρείται αρνητικό. Δεν είναι απαραίτητες περαιτέρω δοκιμές.
(4) Η δοκιμή εκλεκτικής απομόνωσης και η τυπική μορφολογία των αποικιών περιγράφονται στην ενότητα 8.
(5) Η δοκιμή IF περιγράφεται στην ενότητα 4.
(6) Οι δοκιμές PCR περιγράφονται στην ενότητα 6
(7) Η δοκιμή FISH περιγράφεται στην ενότητα 5.
(8) Η βιοδοκιμή περιγράφεται στην ενότητα 7.
(9) Η καλλιέργεια ή οι βιοδοκιμές είναι δυνατόν να αποτύχουν λόγω ανταγωνισμού ή παρεμπόδισης από σαπροφυτικά βακτήρια. Εάν αποκτηθούν θετικά αποτελέσματα στις δοκιμές διαλογής αλλά τα αποτελέσματα των δοκιμών απομόνωσης είναι αρνητικά, πρέπει να επαναληφθούν οι δοκιμές απομόνωσης και, εάν είναι απαραίτητο να ελεχθούν πρόσθετα δείγματα.
(10) Η αξιόπιστη ταυτοποίηση καθαρών πιθανών καλλιεργειών του C. m. subsp. *sepedonicus* επιτυγχάνεται με τη χρήση των οκιμών που αναφέρονται στην ενότητα 9.
(11) Η δοκιμή παθογένειας περιγράφεται στην ενότητα 10.

2. ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΓΙΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΔΑΚΤΥΛΙΩΤΗΣ ΣΗΨΗΣ

2.1. Φυτά πατάτας

Στις ευρωπαϊκές κλιματολογικές συνθήκες, τα συμπτώματα σπανίως εντοπίζονται στον αγρό παραγωγής και συχνά μόνον στο τέλος εποχής. Επιπροσθέτως, τα συμπτώματα είναι συχνά κεκαλυμμένα ή συγχέονται με άλλες ασθένειες, το γήρας ή μηχανικές βλάβες. Ως εκ τούτου, είναι εύκολο τα συμπτώματα να διαφύγουν την προσοχή κατά τις επιθεωρήσεις του αγρού. Τα συμπτώματα μάρανσης είναι πολύ διαφορετικά από αυτά της καστανής σήψης· πρόκειται συνήθως για βραδεία μάρανση, η οποία αρχικά είναι περιορισμένη στην περίμετρο των φύλλων. Τα νεαρά προσβεβλημένα φύλλα συχνά συνεχίζουν να μεγαλώνουν αλλά αυτό συμβαίνει σε μικρότερη κλίμακα στις προσβεβλημένες ζώνες. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία φύλλων με περίεργο σχήμα. Στα φύλλα που έχουν επηρεαστεί από την έμφραξη του αγγειώδους ιστού σε χαμηλότερο τμήμα του στελέχους συχνά αναπτύσσονται χλωρωτικές, κίτρινες προς πορτοκαλί, εσωπλευρικές περιοχές. Τα προσβεβλημένα φυλλίδια, φύλλα καθώς και τα στελέχη ακόμη ενδέχεται στο τέλος να νεκρωθούν. Συχνά τα φύλλα και οι κόνδυλοι απλά έχουν μειωμένο μέγεθος. Σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται νανισμός των φυτών. Στον ιστοχώρο http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main υπάρχουν έγχρωμες φωτογραφίες ενός εύρους συμπτωμάτων.

2.2. Κόνδυλοι πατάτας

Τα αρχικά συμπτώματα συνίστανται σε ελαφρώς υαλώδη μορφή ή σε ελαφρή διαφάνεια του ιστού, χωρίς μείωση της σκληρότητας, γύρω από το σύστημα των αγγείων, ιδίως κοντά στο σημείο πρόσφυσης του στολονίου. Ο δακτύλιος των αγγείων κοντά στο σημείο πρόσφυσης του στολονίου ενδέχεται να είναι ελαφρώς σκουρότερος απ' ότι συνήθως. Το πρώτο εύκολα αναγνωρίσιμο σύμπτωμα είναι ο υποκίτρινος χρωματισμός του δακτυλίου των αγγείων και το τυρώδες εξίδρωμα που εξέρχεται από τα αγγεία όταν συμπιέζονται ελαφρώς. Το εξίδρωμα αυτό περιέχει εκατομμύρια βακτηρίων. Ενίοτε εμφανίζεται και καστανόχρωμος χρωματισμός του αγγειώδους ιστού και τα συμπτώματα των κονδύλων στο στάδιο αυτό είναι όμοια με αυτά της καστανής σήψης που προκαλείται από το *Ralstonia solanacearum*. Αρχικά, τα συμπτώματα αυτά εμφανίζονται σε ένα μόνον τμήμα του δακτυλίου των αγγείων και όχι απαραίτητα κοντά στο σημείο πρόσφυσης του στολονίου, στη συνέχεια δε ενδέχεται να επεκταθούν σ' ολόκληρο το δακτύλιο. Η επέκταση της μόλυνσης οδηγεί σε καταστροφή του αγγειώδους ιστού· ενδέχεται δε να παρατηρηθεί και αποκόλληση του εξωτερικού φλοιού από τον εσωτερικό. Σε προχωρημένα στάδια της μόλυνσης, εμφανίζονται στην επιφάνεια του κονδύλου ρωγμές, τα χείλη των οποίων είναι συχνά καστανοκόκκινα. Πρόσφατα υπήρξαν στην Ευρώπη αρκετές περιπτώσεις που η σήψη του κεντρικού φλοιού λαμβάνει χώρα παράλληλα με αυτήν του αγγειώδους δακτυλίου και έχει ως αποτέλεσμα δευτερογενή μόλυνση με δημιουργία εσωτερικών κοιλοτήτων και νέκρωση. Οι δευτερογενείς μολύνσεις από μύκητες ή βακτήρια καλύπτουν ενίοτε τα συμπτώματα αυτά και συχνά είναι δύσκολο, αν όχι αδύνατο, να διακριθούν τα προχωρημένου σταδίου συμπτώματα της δακτυλιωτής σήψης από άλλες σήψεις των κονδύλων. Ενδέχεται να υπάρχουν επίσης άτυπα συμπτώματα. Στον ιστοχώρο http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main υπάρχουν έγχρωμες φωτογραφίες ενός εύρους συμπτωμάτων.

3. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

3.1. Κόνδυλοι πατάτας

Σημείωση:

— *Το τυπικό μέγεθος δείγματος είναι 200 κόνδυλοι ανά δοκιμή. Για πιο εντατική δειγματοληψία απαιτούνται περισσότερες δοκιμές σε δείγματα του μεγέθους αυτού. Τυχόν μεγαλύτεροι αριθμοί κονδύλων στο δείγμα θα έχουν ως αποτέλεσμα παρεμπόδιση ή δυσκολίες στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Η διαδικασία όμως μπορεί να εφαρμοσθεί και για δείγματα μικρότερα των 200 κονδύλων στην περίπτωση που είναι λιγότεροι οι διαθέσιμοι κόνδυλοι.*

— *Η επικύρωση όλων των μεθόδων ανίχνευσης που περιγράφονται στη συνέχεια βασίζεται στη διενέργεια δοκιμών σε δείγματα 200 κονδύλων.*

— *Το εκχύλισμα πατάτας που περιγράφεται παρακάτω μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του βακτηρίου της καστανής σήψης, Ralstonia solanacearum.*

Προαιρετική προεπεξεργασία πριν από την παρασκευή του δείγματος:

Πλένονται οι κόνδυλοι. Χρησιμοποιούνται κατάλληλα απολυμαντικά (χλωριούχες ενώσεις εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί η δοκιμή PCR με στόχο την απομάκρυνση τυχόν DNA του παθογόνου) και απορρυπαντικά μετά από κάθε δείγμα. Οι κόνδυλοι στεγνώνουν στον αέρα. Η ανωτέρω διαδικασία πλύσης είναι ιδιαίτερα χρήσιμη (αλλά δεν απαιτείται) για δείγματα που περιβάλλονται από υπερβολικό χώμα καθώς και στην περίπτωση που πρόκειται να εφαρμοσθεί η δοκιμή PCR ή η διαδικασία άμεσης απομόνωσης.

3.1.1. Με ένα καθαρό και απολυμασμένο νυστέρι ή ειδικό μαχαίρι λαχανικών, αφαιρείται η επιδερμίδα γύρω από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου του κονδύλου έτσι ώστε να φανούν οι αγγειώδεις ιστοί. Αποκόπτουμε με προσοχή ένα μικρό κώνο αγγειώδους ιστού από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου και προσέχουμε ώστε η αφαιρούμενη ποσότητα μη αγγειώδους ιστού να είναι η ελάχιστη δυνατή (βλέπε ιστοχώρο http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

Σημείωση:

Κάθε κόνδυλος που παρουσιάζει συμπτώματα που γεννούν υπόνοιες για ύπαρξη δακτυλιωτής σήψης αφήνεται παράμερα και εξετάζεται χωριστά.

Εάν κατά τη διάρκεια της αφαίρεσης του κώνου από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου παρατηρηθούν συμπτώματα που γεννούν υπόνοιες για ύπαρξη δακτυλιωτής σήψης θα πρέπει να διενεργηθεί μακροσκοπική επιθεώρηση του κονδύλου και να κοπεί ο κόνδυλος αυτός κοντά στο σημείο πρόσφυσης του στολονίου. Όλοι οι κομμένοι κόνδυλοι με πιθανά συμπτώματα της ασθένειας πρέπει να φελλοποιούνται για 2 τουλάχιστον ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου και να φυλάσσονται σε καραντίνα (4–10 °C) έως ότου ολοκληρωθούν όλες οι δοκιμές. Όλοι οι κόνδυλοι του δείγματος, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που παρουσιάζουν πιθανά συμπτώματα της ασθένειας, πρέπει να διατηρούνται σύμφωνα με όσα προβλέπονται στο παράρτημα II.

3.1.2. Οι κώνοι που έχουν ληφθεί από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου συλλέγονται σε μη χρησιμοποιηθέντες περιέκτες μιας χρήσης, οι οποίοι είναι δυνατόν να είναι κλεισμένοι ή/και σφραγισμένοι (στην περίπτωση που οι περιέκτες έχουν ξαναχρησιμοποιηθεί θα πρέπει να καθαρισθούν επιμελώς και να

απολυμανθούν με χλωριούχες ενώσεις). Είναι προτιμότερο να υποβάλλονται οι κώνοι από τα σημεία πρόσφυσης του στολονίου σε κατεργασία αμέσως. Εάν αυτό δεν είναι δυνατόν, αποθηκεύονται στον περιέκτη, χωρίς την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος, στο ψυγείο για 72 ώρες το ανώτατο ή σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες το ανώτατο. Το στέγνωμα και η φελλοποίηση των κώνων καθώς και η ανάπτυξη των σαπρόφυτων κατά την αποθήκευση ενδέχεται να παρεμποδίσουν την ανίχνευση του βακτηρίου της δακτυλιωτής σήψης.

3.1.3. Οι κώνοι από τα σημεία πρόσφυσης του στολονίου υποβάλλονται σε κατεργασία με μία από τις ακόλουθες διαδικασίες:

(α) Οι κώνοι καλύπτονται με επαρκή όγκο (περίπου 40 ml) ρυθμιστικού διαλύματος εξαγωγής (προσάρτημα 3) και αναταρράσσονται σε περιστροφικό αναδευτήρα (50-100 rpm) για 4 ώρες σε θερμοκρασία χαμηλότερη των 24 °C ή για 16-24 ώρες στο ψυγείο·

ή

(β) οι κώνοι ομοιογενοποιούνται με επαρκή όγκο (περίπου 40 ml) ρυθμιστικού διαλύματος εξαγωγής (προσάρτημα 3), είτε σε αναμείκτη (π.χ. Waring ή Ultra Thurax) είτε με σύνθλιψη σε σφραγισμένο σάκο διαβροχής μίας χρήσης (π.χ. Stomacher ή Bioreba strong guage polythene, 150 mm x 250 mm· αποστειρωμένα διά ακτινοβολίας) χρησιμοποιώντας λαστιχένια ματσόλα ή τον κατάλληλο εξοπλισμό σύνθλιψης (π.χ. Homex).

Σημείωση:

Ο κίνδυνος επιμόλυνσης των δειγμάτων είναι υψηλός όταν τα δείγματα έχουν ομοιογενοποιηθεί με τη χρήση αναμείκτη. Πρέπει να ληφθούν προφυλάξεις για την αποφυγή της δημιουργίας αερολύματος ή υπερχείλισης κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εξαγωγής. Πρέπει να εξασφαλισθεί ότι για κάθε δείγμα οι λεπίδες και τα δοχεία του αναμεικτήρα αποστειρώνονται λίγο πριν την έναρξη της διαδικασίας. Εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί η δοκιμή PCR, πρέπει να αποφευχθεί η μεταφορά DNA στους περιέκτες ή τον εξοπλισμό σύνθλιψης. Στις περιπτώσεις που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί η PCR, συνιστάται η σύνθλιψη σε σάκους μιας χρήσης καθώς και η χρήση σωλήνων μιας χρήσης.

3.1.4. Το υπερκείμενο υγρό μεταγγίζεται. Εφόσον το υγρό εμφανίζεται θολό, καθίσταται διαυγές είτε με φυγοκέντριση σε χαμηλή ταχύτητα (όχι περισσότερο από 180 g για10 λεπτά σε θερμοκρασία 4-10 °C) είτε με διήθηση (40-100 μm), με αντλία κενού πλένοντας το φίλτρο με πρόσθετο (10 ml) ρυθμιστικό διάλυμα εξαγωγής (προσάρτημα 3).

3.1.5. Το βακτηριακό κλάσμα συγκεντρώνεται με φυγοκέντριση σε 7 000 g για 15 λεπτά (ή 10 000 g για 10 λεπτά) σε θερμοκρασία 4-10 °C και το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα.

3.1.6. Το ίζημα αναδιαλύεται σε 1,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος του ιζήματος (προσάρτημα 3). Χρησιμοποιούνται 500 μl για τον έλεγχο *C. m.* subsp. *sepedonicus*, 500 μl για το *Ralstonia solanacearum* και 500 μl για σκοπούς αναφοράς. Προστίθεται αποστειρωμένη γλυκερίνη σε τελική συγκέντρωση 10-25 % (v/v) στα 500 μl της ποσότητας αναφοράς και στην εναπομείνασα ποσότητα δοκιμής, ανακατεύουμε με στροβιλισμό (vortex) και αποθηκεύουμε σε θερμοκρασία – 16 έως – 24 °C (εβδομάδες) ή στους – 68 έως – 86 °C (μήνες). Οι ποσότητες δοκιμών διατηρούνται σε θερμοκρασία 4-10 °C κατά τη διεξαγωγή των δοκιμών.

Δεν συνιστάται η επαναλαμβανόμενη κατάψυξη και απόψυξη.

Εάν απαιτείται η μεταφορά του εκχυλίσματος, πρέπει να εξασφαλισθεί ότι η διανομή θα πραγματοποιηθεί σε ψυκτικό δοχείο εντός 24 έως 48 ωρών.

3.1.7. Είναι επιτακτικό, όπως όλοι οι θετικοί μάρτυρες του *C. m.* subsp. *sepedonicus* και τα δείγματα κατεργάζονται χωριστά ώστε να αποφεύγεται η επιμόλυνση. Το ίδιο ισχύει και για τις αντικειμενοφόρους της δοκιμής IF και για όλες τις δοκιμές.

3.2. Φυτά πατάτας

Σημείωση:

Για την ανίχνευση των λανθανόντων πληθυσμών του C. m. subsp. sepedonicus συνιστάται ο έλεγχος σύνθετων δειγμάτων. Η διαδικασία είναι δυνατόν να εφαρμοσθεί κατάλληλα και για σύνθετα δείγματα με έως 200 τμήματα στελεχών. (Εάν πραγματοποιούνται επισκοπήσεις, αυτές πρέπει να βασίζονται σε στατιστικά αντιπροσωπευτικό δείγμα του πληθυσμού φυτών υπό εξέταση.)

3.2.1. Με ένα καθαρό και απολυμασμένο μαχαίρι ή κλαδευτική ψαλίδα, αφαιρείται τμήμα 1-2 cm από τη βάση κάθε στελέχους, πάνω ακριβώς από το έδαφος.

Το εν λόγω τμήμα απολυμαίνεται για σύντομο χρονικό διάστημα με αιθανόλη 70% και στεγνώνεται αμέσως με απορροφητικό χαρτί.

Τα τμήματα στελεχών συλλέγονται σε κλειστό αποστειρωμένο περιέκτη.

3.2.2. Τα τμήματα στελεχών υποβάλλονται σε κατεργασία με μία από τις ακόλουθες διαδικασίες:

(α) Τα τμήματα καλύπτονται με επαρκή όγκο (περίπου 40 ml) ρυθμιστικού διαλύματος εξαγωγής (προσάρτημα 3) και αναταρράσσονται σε περιστροφικό αναδευτήρα (50-100 rpm) για 4 ώρες σε θερμοκρασία χαμηλότερη των 24 °C ή για 16-24 ώρες στο ψυγείο·

ή

(β) υποβάλλονται σε κατεργασία αμέσως με σύνθλιψη των τμημάτων εντός ανθεκτικού σάκκου διαβροχής (π.χ. Stomacher ή Bioreba) με τον κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος εξαγωγής (προσάρτημα 3) χρησιμοποιώντας λαστιχένια ματσόλα ή τον κατάλληλο εξοπλισμό σύνθλιψης (π.χ. Homex). Στην περίπτωση που αυτό δεν είναι δυνατόν, τα τμήματα στελέχους αποθηκεύονται στο ψυγείο για χρονικό διάστημα 72 ωρών το μέγιστο ή σε θερμοκρασία δωματίου για χρονικό διάστημα 24 ωρών το μέγιστο.

3.2.3. Το υπερκείμενο υγρό μεταγγίζεται αφού κατακαθίσει για 15 λεπτά.

3.2.4. Περαιτέρω διαύγαση του εκχυλίσματος ή της συγκέντρωσης του βακτηριακού κλάσματος δεν απαιτείται συνήθως αλλά ειναι δυνατον να επιτευχθεί με διήθηση ή/και φυγοκέντριση όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.1.4-3.1.6.

3.2.5. Το αδιάλυτο ή συγκεντρωμένο εκχύλισμα δείγματος χωρίζεται σε 2 ίσα μέρη. Το ήμισυ διατηρείται σε 4-10 °C κατά τη διεξαγωγή της δοκιμής και το άλλο μισό φυλάσσεται με 10-25 % (v/v) αποστειρωμένη γλυκερίνη σε θερμοκρασία – 16 έως – 24 °C (εβδομάδες) ή σε θερμοκρασία – 68 έως – 86 °C (μήνες) για την περίπτωση που χρειασθεί η διενέργεια περαιτέρω δοκιμών.

4. ΔΟΚΙΜΗ IF

Αρχή

Η χρήση της δοκιμής IF ως αρχικής δοκιμής διαλογής συνιστάται λόγω της αποδεδειγμένης ευρωστίας της για την επίτευξη των απαιτούμενων ορίων.

Όταν η δοκιμή IF χρησιμοποιείται ως αρχική δοκιμή διαλογής και η ανάγνωση IF είναι θετική, πρέπει να πραγματοποιηθεί η δοκιμή PCR ή FISH ως δεύτερη δοκιμή διαλογής. Όταν η δοκιμή IF χρησιμοποιείται ως δεύτερη δοκιμή διαλογής και η ανάγνωση IF είναι θετική, απαιτείται διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών σύμφωνα με το διάγραμμα ροής για την ολοκλήρωση της ανάλυσης.

Σημείωση:

Όταν η δοκιμή IF χρησιμοποιείται ως αρχική δοκιμή διαλογής, χρησιμοποιείται πάντοτε ένα πολυκλωνικό αντίσωμα. Σε περίπτωση θετικής ανάγνωσης IF με πολυκλωνικό αντίσωμα, η περαιτέρω διαλογή του δείγματος με μονοκλωνικό αντίσωμα είναι δυνατόν να παράσχει μεγαλύτερη εξειδίκευση αλλά μπορεί να είναι λιγότερο ευαίσθητη.

Χρησιμοποιούνται αντισώματα σε στέλεχος αναφοράς του C. m. subsp. sepedonicus. Συνιστάται ο προσδιορισμός του τίτλου για κάθε νέα παρτίδα αντισωμάτων. Ως τίτλος ορίζεται η μεγαλύτερη αραίωση στην οποία λαμβάνει χώρα η βέλτιστη αντίδραση όταν υποβάλλεται σε δοκιμή αιώρημα που περιέχει 105 έως 106 κύτταρα ανά ml του ομόλογου στελέχους του C. m. subsp. sepedonicus και χρησιμοποιείται κατάλληλο σύμπλοκο ισοθειοκυανικής φθορεϊσίνης (FITC) σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή. Τα πρωτογενή πολυκλωνικά ή μονοκλωνικά αντισώματα πρέπει να έχουν τίτλο IF τουλάχιστον 1:2 000. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, τα αντισώματα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε αραίωση(-εις) εργασίας (WD) στον τίτλο ή κοντά στον τίτλο. Χρησιμοποιούνται επικυρωμένα αντισώματα (βλέπε ιστοχώρο http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main.)

Η δοκιμή πρέπει να πραγματοποιείται σε εκχυλίσματα δειγμάτων που έχουν μόλις παρασκευασθεί. Εάν είναι απαραίτητο, μπορεί να πραγματοποιηθεί με επιτυχία σε εκχυλίσματα που έχουν αποθηκευθεί σε θερμοκρασία – 68 έως – 86 °C σε γλυκερίνη. Η γλυκερίνη είναι δυνατόν να αφαιρεθεί από το δείγμα με την προσθήκη 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος ιζήματος (προσάρτημα 4), εκ νέου φυγοκέντριση για 15 λεπτά σε 7 000 g και επανασχηματισμό αιωρήματος σε ίσο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος ιζήματος. Συχνά αυτό δεν είναι αναγκαίο, ιδιαίτερα εάν τα δείγματα αντικειμενοφόρου έχουν προσηλωθεί στις αντικειμενοφόρους με διέλευση από φλόγα (βλέπε 2.2).

Παρασκευάζονται ξεχωριστά ως θετικοί μάρτυρες αντικειμενοφόροι από ομόλογο στέλεχος ή άλλο στέλεχος αναφοράς του *C. m.* subsp. *sepedonicus*, που είναι αιώρημα σε εκχύλισμα πατάτας, όπως περιγράφεται στο προσάρτημα 2, και προαιρετικά σε ρυθμιστικό διάλυμα.

Ως παρόμοιοι μάρτυρες πρέπει να χρησιμοποιούνται, όποτε είναι δυνατόν, στην ίδια αντικειμενοφόρο, φυσικώς μολυσμένοι ιστοί (που διατηρούνται με λυοφιλίωση ή κατάψυξη στους – 16 έως – 24 °C).

Ως αρνητικοί μάρτυρες, χρησιμοποιούνται κατάλληλες ποσότητες εκχυλίσματος δείγματος που προηγουμένως είχε δοκιμαστεί και ήταν αρνητικό.

Χρησιμοποιούνται πολυφατνιακές αντικειμενοφόροι πλάκες μικροσκοπίου με 10 κατά προτίμηση φατνία διαμέτρου τουλάχιστον 6 mm.

Η δοκιμή του υλικού των μαρτύρων γίνεται με τον ίδιο τρόπο όπως αυτή του ή των δειγμάτων.

4.1. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες δοκιμής προετοιμάζονται με μία από τις ακόλουθες διαδικασίες:

(i) Για ιζήματα με μικρή σχετικά ποσότητα ιζήματος αμύλου:

Στο πρώτο φατνίο, φέρεται μετρημένος με σιφώνιο συγκεκριμένος όγκος (15 μl είναι αρκετός για φατνία με διάμετρο 6 mm - ο όγκος κλιμακώνεται προς τα άνω για μεγαλύτερα φατνία) αραίωσης 1/100 του αιωρήματος του ιζήματος πατάτας. Στη συνέχεια, φέρεται με σιφώνιο όμοιος όγκος μη αραιωμένου ιζήματος (1/1) στα υπόλοιπα φατνία διαδοχικά. Η δεύτερη σειρά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείγμα εις διπλούν ή ως δεύτερο δείγμα όπως φαίνεται στην εικόνα 1.

(ii) Για άλλα ιζήματα:

Παρασκευάζονται δεκαδικές αραιώσεις (1/10 και 1/100) του αιωρήματος του ιζήματος σε ρυθμιστικό διάλυμα ιζήματος. Σε μία σειρά φατνίων, φέρεται μετρημένος με σιφώνιο συγκεκριμένος όγκος (15 μl είναι αρκετός για φατνία με διάμετρο 6 mm – ο όγκος κλιμακώνεται προς τα άνω για μεγαλύτερα φατνία) του αιωρήματος του ιζήματος και κάθε αραίωση. Η δεύτερη σειρά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως επανάληψη του πρώτου δείγματος ή για ένα δεύτερο δείγμα όπως φαίνεται στην εικόνα 2.

4.2. Τα σταγονίδια στεγνώνονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή με θέρμανση σε θερμοκρασίες 40 έως 45 °C. Τα βακτηριακά κύτταρα προσηλώνονται στην αντικειμενοφόρο με θέρμανση (15 λεπτά στους 60 °C), με φλόγα, με 95 % αιθανόλη ή σύμφωνα με τις συγκεκριμένες οδηγίες των προμηθευτών των αντισωμάτων.

Εάν είναι απαραίτητο, οι προσηλωμένες αντικειμενοφόροι είναι δυνατόν να φυλαχθούν στη συνέχεια στην κατάψυξη σε αφυδατωμένο δοχείο για όσο το δυνατόν μικρότερο χρονικό διάστημα (το μέγιστο για 3 μήνες) προτού υποβληθούν σε περαιτέρω δοκιμές.

4.3. Διαδικασία IF

(i) Σύμφωνα με την προετοιμασία της αντικειμενοφόρου δοκιμής στο σημείο 4.1.(i):

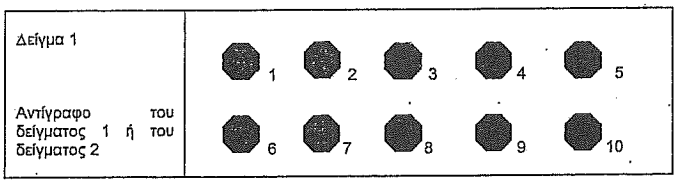
Παρασκευάζεται μία σειρά αραιώσεων του αντισώματος στο διπλάσιο σε ρυθμιστικό διάλυμα για IF. Το πρώτο φατνίο πρέπει να έχει 1/2 του τίτλου (T/2), τα υπόλοιπα 1/4 του τίτλου (T/4), 1/2 του τίτλου (T/2), τον τίτλο (T) και το διπλάσιο του τίτλου (2T).

(ii) Σύμφωνα με την ετοιμασία της αντικειμενοφόρου προς δοκιμή στο σημείο 4.1.(ii):

Παρασκευάζεται η αραίωση εργασίας (WD) του αντισώματος σε ρυθμιστικό διάλυμα για IF. Η αραίωση εργασίας επηρεάζει την εξειδίκευση.

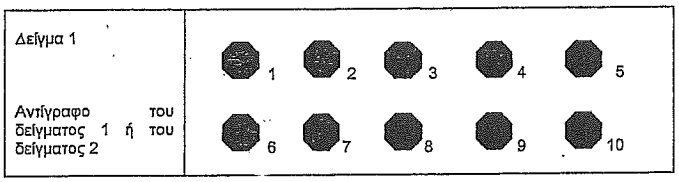
Εικόνα 1. Προετοιμασία της αντικειμενοφόρου πλάκας δοκιμής σύμφωνα με τα σημεία 4.1.(i) και 4.3.(i)

	Αραιώσεις του αναδιαλυμένου ιζήματος					
	1/100	1/1	1/1	1/1	1/1	☐ Αραίωση του αναδιαλυμένου ιζήματος
(T = τίτλος)	T/2	T/4	T/2	T	2T	☐ Αραιώσεις του αντιορρού / αντισώματος στο διπλάσιο



Εικόνα 2. Προετοιμασία της αντικειμενοφόρου πλάκας δοκιμής σύμφωνα με τα σημεία 4.1.(ii) και 4.3.(ii)

Αραίωση εργασίας του αντιορρού/αντισώματος					
1/1	1/10	1/100	κενό	κενό	☐ Δεκαδική αραίωση του αναδιαλυμένου ιζήματος



4.3.1. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες διευθετούνται πάνω σε ένυγρο χαρτί. Κάθε φατνίο δοκιμής καλύπτεται πλήρως με την ή τις αραιώσεις του αντισώματος. Ο όγκος του αντισώματος που εφαρμόζεται σε κάθε φατνίο πρέπει να είναι τουλάχιστον ίσος με τον όγκο του εφαρμοσθέντος εκχυλίσματος.

Η ακόλουθη διαδικασία πρέπει να εφαρμόζεται στην περίπτωση που δεν υπάρχουν συγκεκριμένες οδηγίες από τους προμηθευτές των αντισωμάτων:

4.3.2. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες επωάζονται σε ένυγρο χαρτί κάτω από ένα κάλυμμα για 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (18-25 °C).

4.3.3. Τα σταγονίδια απομακρύνονται με ένα ελαφρό τίναγμα από την αντικειμενοφόρο και ακολουθεί προσεκτικό ξέπλυμα με ρυθμιστικό διάλυμα IF. Πλένονται με βύθισμα για 5 λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα IF-Tween (προσάρτημα 3) και στη συνέχεια για 5 λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα IF. Πρέπει να αποφεύγεται η δημιουργία αερολυμάτων ή η μεταφορά σταγονιδίων που θα μπορούσαν να έχουν ως αποτέλεσμα την επιμόλυνση. Η περίσσεια νερού αφαιρείται προσεκτικά χρησιμοποιώντας με απαλές κινήσεις ένα στυπόχαρτο.

4.3.4. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες διευθετούνται πάνω σε ένυγρο χαρτί. Τα φατνία δοκιμής καλύπτονται με την αραίωση του συμπλόκου FITC που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του τίτλου. Ο όγκος του χρησιμοποιούμενου στα φατνία συμπλόκου πρέπει να είναι ίδιος με τον όγκο του εφαρμοσθέντος αντισώματος.

4.3.5. Οι αντικειμενοφόροι επωάζονται σε ένυγρο χαρτί κάτω από ένα κάλυμμα για 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (18-25 °C).

4.3.6. Τα σταγονίδια του συμπλόκου απομακρύνονται με ελαφρό τίναγμα από την αντικειμενοφόρο. Οι αντικειμενοφόροι ξεπλένονται και πλένονται όπως προηγουμένως (4.3.3).

Η περίσσεια υγρασίας αφαιρείται προσεκτικά.

4.3.7. Σε κάθε φατνίο φέρονται με σιφώνιο 5-10 μl 0,1 M φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος γλυκερίνης (προσάρτημα 3) ή εμπορικού αντιξεθωριαστικού υλικού έγκλεισης και τα φατνία καλύπτονται με μία καλυπτρίδα.

4.4. Ανάγνωση της δοκιμής IF

4.4.1. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες δοκιμής εξετάζονται σε μικροσκόπιο επιφθορισμού με φίλτρα κατάλληλα για τη διέγερση του FITC, με έλαιο – ή υδατοκαταδυτικό φακό σε μεγέθυνση 500-1 000x. Τα φατνία εξετάζονται κατά δύο κάθετες διαμέτρους και κατά την περίμετρό τους. Όσον αφορά τα δείγματα που δεν δείχνουν καθόλου κύτταρα ή δείχνουν μικρό αριθμό κυττάρων, πρέπει να παρατηρηθούν τουλάχιστον 40 πεδία μικροσκοπίου.

Πρώτα ελέγχεται η αντικειμενοφόρος του θετικού μάρτυρα. Τα κύτταρα πρέπει να είναι πλήρως χρωσμένα με λαμπρό φθορισμό στον προσδιορισμένο τίτλο αντισώματος ή την αραίωση εργασίας. Σε περίπτωση παρέκκλισης της χρώσης, η δοκιμή IF (ενότητα 4) επαναλαμβάνεται.

4.4.2. Εξετάζεται εάν υπάρχουν λαμπρώς φθορίζοντα κύτταρα με τη χαρακτηριστική μορφολογία του *C. m.* subsp. *sepedonicus* στα φατνία δοκιμής των αντικειμενοφόρων πλακών δοκιμής (βλέπε ιστοχώρο http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Η ένταση του φθορισμού πρέπει να είναι ισοδύναμη ή καλύτερη από εκείνη του θετικού μάρτυρα με ίδια αραίωση αντισώματος. Κύτταρα με ατελή χρώση ή με ασθενή φθορισμό δεν πρέπει να λαμβάνονται υπόψη.

Εάν υπάρχει υποψία μόλυνσης, η δοκιμή πρέπει να επαναληφθεί. Κάτι τέτοιο υπάρχει περίπτωση να συμβεί εάν όλες οι αντικειμενοφόροι μιας παρτίδας δείχνουν θετικά κύτταρα λόγω της μόλυνσης του ρυθμιστικού διαλύματος ή εάν βρεθούν θετικά κύτταρα (εκτός των φατνίων της αντικειμενοφόρου) στην επικάλυψη της αντικειμενοφόρου.

4.4.3. Υπάρχουν διάφορα προβλήματα σύμφυτα με την εξειδίκευση της δοκιμής ανοσοφθορισμού. Τα ιζήματα των κώνων από τα σημεία πρόσφυσης του στολονίου και των τμημάτων του στελέχους περιέχουν συχνά πληθυσμούς φθοριζόντων κυττάρων μη τυπικής μορφολογίας καθώς και μη ειδικώς αντιδρώντα σαπροφυτικά βακτήρια όμοιου μεγέθους και μορφολογίας με το *C. m.* ssp. *sepedonicus*.

4.4.4. Λαμβάνονται υπόψη μόνον τα φθορίζοντα κύτταρα τυπικού μεγέθους και μορφολογίας στον τίτλο ή την αραίωση εργασίας των αντισωμάτων όπως στο σημείο 4.3.

4.4.5. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων IF:

(i) Εάν βρίσκονται λαμπρώς φθορίζοντα κύτταρα με χαρακτηριστική μορφολογία, εκτιμάται ο μέσος αριθμός τυπικών κυττάρων ανά πεδίο μικροσκοπίου και υπολογίζεται ο αριθμός των τυπικών κυττάρων ανά ml του αναδιαλυμένου ιζήματος (προσάρτημα 4).

Η ανάγνωση IF είναι θετική για δείγματα με τουλάχιστον 5×10^3 τυπικά κύτταρα ανά ml του αναδιαλυμένου ιζήματος. Το δείγμα θεωρείται ενδεχομένως μολυσμένο και απαιτείται η διενέργεια περαιτέρω δοκιμών.

(ii) Η ανάγνωση IF είναι αρνητική για δείγματα με λιγότερα από 5×10^3 κύτταρα ανά ml αναδιαλυμένου ιζήματος και το δείγμα θεωρείται αρνητικό. Δεν απαιτείται η διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών.

5. ΔΟΚΙΜΗ FISH

Αρχή

Όταν η δοκιμή FISH χρησιμοποιείται ως αρχική δοκιμή διαλογής και τα αποτελέσματα είναι θετικά, πρέπει να πραγματοποιηθεί η δοκιμή IF ως δεύτερη υποχρεωτική δοκιμή διαλογής. Όταν η δοκιμή FISH χρησιμοποιείται ως δεύτερη δοκιμή διαλογής και έχει θετικά αποτελέσματα, απαιτείται διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών σύμφωνα με το διάγραμμα ροής για την ολοκλήρωση της διάγνωσης.

Σημείωση:

Χρησιμοποιούνται επικυρωμένοι ολιγοανιχνευτές ειδικοί για το C. m. subsp. sepedonicus (προσάρτημα 7). Οι προκαταρκτικές δοκιμές με τη μέθοδο αυτή θα πρέπει να επιτρέπουν την αναπαραγώγιμη ανίχνευση τουλάχιστον 10^3-10^4 κυττάρων του C. m. subsp. sepedonicus ανά ml που προστίθενται σε εκχυλίσματα δειγμάτων που προηγουμένως ήταν αρνητικά στη δοκιμή.

Η ακόλουθη διαδικασία είναι προτιμότερο να πραγματοποιείται σε εκχύλισμα δείγματος που έχει μόλις παρασκευασθεί αλλά είναι επίσης δυνατόν να πραγματοποιηθεί με επιτυχία σε εκχύλισμα δείγματος που έχει αποθηκευθεί με γλυκερίνη στους – 16 έως – 24 °C ή τους – 68 έως – 86 °C.

Ως αρνητικοί μάρτυρες, χρησιμοποιούνται κατάλληλες ποσότητες εκχυλίσματος δείγματος που προηγουμένως ήταν αρνητικό στις δοκιμές για το *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

Ως θετικοί μάρτυρες, παρασκευάζονται αιωρήματα που περιέχουν 10^5 έως 10^6 κύτταρα ανά ml του *C. m.* subsp. *sepedonicus* (π.χ. στέλεχος NCPPB 4053 ή PD 406) σε 0,01M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PB) από καλλιέργεια 3 – 5 ημερών (για την παρασκευή βλέπε προσάρτημα 2). Παρασκευάζονται ξεχωριστά ως θετικοί μάρτυρες αντικειμενοφόροι πλάκες από ομόλογο στέλεχος ή άλλο στέλεχος αναφοράς του *C. m.* subsp. *sepedonicus*, που έχει γίνει αιώρημα σε εκχύλισμα πατάτας, όπως περιγράφεται στο προσάρτημα 2.

Η χρήση ολιγοανιχνευτή ευβακτηρίων σημασμένου με FITC παρέχει μάρτυρα για τη διαδικασία υβριδισμού, καθώς χρωματίζει όλα τα ευβακτήρια που βρίσκονται στο δείγμα.

Το υλικό των μαρτύρων δοκιμάζεται με τρόπο ταυτόσημο με εκείνο του ή των δειγμάτων.

5.1. Προσήλωση του εκχυλίσματος πατάτας

Το ακόλουθο πρωτόκολλο βασίζεται στον Wullings *et al.*, (1998):

5.1.1. Παρασκευάζεται το προσηλωτικό διάλυμα (βλέπε προσάρτημα 7).

5.1.2. Φέρονται με σιφώνιο 100 μl κάθε εκχυλίσματος δείγματος σε σωλήνα Eppendorf και φυγοκεντρούνται για 8 λεπτά σε 7 000 g.

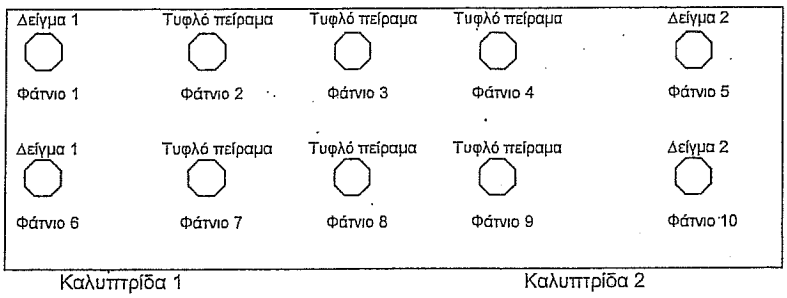
5.1.3. Αφαιρείται το υπερκείμενο υγρό και το ίζημα διαλύεται σε 500 μl προσηλωτικού υγρού που έχει παρασκευασθεί λιγότερο από 24 ώρες πριν. Ανακατεύουμε με στροβιλισμό (vortex) και επωάζουμε για μία νύκτα στους 4 °C.

Εναλλακτικό προσηλωτικό υγρό είναι διάλυμα 96 % αιθανόλης. Για τη χρησιμοποίησή του το ίζημα, από το βήμα 5.1.2 διαλύεται σε 50 μl 0,01 M ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PB) και 50 μl 96 % αιθανόλης. Ανακατεύουμε με στροβιλισμό (vortex) και επωάζουμε στους 4 °C για 30-60 λεπτά.

5.1.4. Φυγοκεντρείται για 8 λεπτά σε 7 000 g, αφαιρείται το υπερκείμενο υγρό και το ίζημα αναδιαλύεται σε 75 μl 0,01 M ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PB) (βλέπε προσάρτημα 3).

5.1.5. Τοποθετούνται κατά κηλίδες 16 μl των προσηλωμένων αιωρημάτων σε καθαρή αντικειμενοφόρο πολλαπλών δοκιμών όπως φαίνεται στην Εικόνα 3. Εφαρμόζονται 2 διαφορετικά, μη αραιωμένα, δείγματα ανά αντικειμενοφόρο και χρησιμοποιούνται 10 μl για τη δημιουργία αραίωσης 1:100 (σε 0,01 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών). Το εναπομείναν διάλυμα δείγματος (49 μl) μπορεί να αποθηκευθεί στους −20 °C μετά την προσθήκη 1 όγκου 96 % αιθανόλης. Στην περίπτωση που η δοκιμή FISH πρέπει να επαναληφθεί, αφαιρείται η αιθανόλη με φυγοκέντριση και προστίθεται ίσος όγκος 0,01 M ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών [αναμειγνύουμε με στροβιλισμό (vortex)].

Εικόνα 3. Σχέδιο αντικειμενοφόρου FISH



5.1.6. Οι αντικειμενοφόροι στεγνώνουν στον αέρα (ή σε στεγνωτήρα αντικειμενοφόρου στους 37 °C) και προσηλώνονται με διέλευση από φλόγα.

Στο στάδιο αυτό η διαδικασία είναι δυνατόν να διακοπεί και να συνεχισθεί ο υβριδισμός την επόμενη ημέρα. Οι αντικειμενοφόροι πρέπει να αποθηκεύονται απαλλαγμένες από σκόνη και στεγνές σε θερμοκρασία δωματίου.

5.2. Προϋβριδισμός και υβριδισμός

5.2.1. Παρασκευάζεται διάλυμα λυσοζύμης που περιέχει 10 mg λυσοζύμης (Sigma L-6876) σε 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8,0). Το διάλυμα αυτό μπορεί να αποθηκευθεί αλλά επιτρέπεται να καταψυχθεί και να αποψυχθεί μόνον μία φορά. Το φατνίο κάθε δείγματος καλύπτεται με περίπου 50 μl διαλύματος λυσοζύμης και επωάζεται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια οι αντικειμενοφόροι βυθίζονται σε απιονισμένο νερό, μία μόνον φορά και στεγνώνονται με διηθητικό χαρτί.

Εναλλακτικά, αντί λυσοζύμης προστίθενται σε κάθε φατνίο 50 μl διαλύματος 40-400 μg ml-1 πρωτεάσης K σε ρυθμιστικό διάλυμα (20 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl2, pH 7,4) και επωάζουμε σε 37 °C για 30 λεπτά.

5.2.2. Τα κύτταρα αφυδατώνονται σε διαβαθμισμένη σειρά αιθανόλης των 50%, 80% και 96% για ένα λεπτό σε κάθε μία. Οι αντικειμενοφόροι στεγνώνονται στον αέρα σε υποδοχέα αντικειμενοφόρων.

5.2.3. Παρασκευάζεται ένας υγρός θάλαμος επώασης με κάλυψη του πυθμένα ενός αεροστεγούς δοχείου με απορροφητικό ή διηθητικό χαρτί που έχει εμβαπτισθεί σε 1x μείγμα υβριδισμού (hybmix) (προσάρτημα 7). Το δοχείο προεπωάζεται στον κλίβανο υβριδισμού στους 55 °C για τουλάχιστον 10 λεπτά.

5.2.4. Παρασκευάζεται το διάλυμα υβριδισμού '28προσάρτημα 7) θεωρώντας 45 μl ανά αντικειμενοφόρο πλάκα και προεπωάζεται για 5 λεπτά στους 55 °C.

5.2.5. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες τοποθετούνται σε θερμή πλάκα θερμοκρασίας 45 °C και εφαρμόζονται 10 μl διαλύματος υβριδισμού σε καθένα από τα 4 φατνία στην(-ις) αντικειμενοφόρο(-ους).

5.2.6. Εφαρμόζονται 2 καλυπτρίδες (24 × 24 mm) σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα χωρίς να εγκλωβιστεί αέρας. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες τοποθετούνται στον προθερμασμένο υγρό θάλαμο και ο υβριδισμός πραγματοποιείται όλη τη νύκτα στον κλίβανο σε θερμοκρασία 55 °C στο σκοτάδι.

5.2.7. Παρασκευάζονται 3 ποτήρια ζέσεως που περιέχουν αντίστοιχα 1 l υπέρ καθαρό νερό (UPW), 1 l από 1x hybmix (334 ml 3x hybmix και 666 ml UPW) και 1 l από 1/2x hybmix (167 ml 3x hybmix και 833 ml UPW). Έκαστο προεπωάζεται σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 55 °C.

5.2.8. Απομακρύνονται οι καλυπτρίδες από τις αντικειμενοφόρους πλάκες και οι αντικειμενοφόροι πλάκες τοποθετούνται στον υποδοχέα αντικειμενοφόρων.

5.2.9. Ξεπλένεται η περίσσεια ανιχνευτού με επώαση για 15 λεπτά στο ποτήρι ζέσεως με 1x hybmix στους 55 °C.

5.2.10. Ο υποδοχέας αντικειμενοφόρων πλακών μεταφέρεται σε διάλυμα πλυσίματος 1/2 hybmix και επωάζουμε για 15 λεπτά ακόμη.

5.2.11. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες βυθίζονται για σύντομο χρονικό διάστημα σε UPW και τοποθετούνται σε διηθητικό χαρτί. Η περίσσεια υγρασίας απομακρύνεται καλύπτοντας την επιφάνεια απαλά με διηθητικό χαρτί. Προστίθενται με σιφώνιο 5-10μl αντιξεθωριαστικού διαλύματος έγκλεισης (e.g. Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA ή ισοδύναμα) σε κάθε φατνίο και εφαρμόζεται μεγάλη καλυπτρίδα (24 × 60 mm) σε ολόκληρη την αντικειμενοφόρο πλάκα.

5.3. Ανάγνωση της δοκιμής FISH

5.3.1. Εξετάζονται οι αντικειμενοφόροι πλάκες αμέσως με μικροσκόπιο προσαρμοσμένο για μικροσκοπία επιφθορισμού σε μεγένθυση 630 ή 1 000x με έλαιο κατάδυσης. Με φίλτρο κατάλληλο για ισοθειοκυανική φθορεϊσίνη (FITC), τα ευβακτηριακά κύτταρα (συμπεριλαμβανομένων των περισσοτέρων αρνητικών κατά Gram κυττάρων) στο δείγμα είναι χρωσμένα πράσινα φθορίζοντα. Εάν χρησιμοποιηθεί φίλτρο 5-ισοθειοκυανικής τετραμεθυλοροδαμίνης, τα κύτταρα του *C. m.* subsp. *sepedonicus* που έχουν χρωσθεί με Cy3 εμφανίζονται φθορίζοντα κόκκινα. Συγκρίνεται η μορφολογία των κυττάρων με αυτή των θετικών μαρτύρων. Τα κύτταρα πρέπει να είναι πλήρως χρωσμένα με λαμπρό φθορισμό. Η δοκιμή FISH (ενότητα 9.4) πρέπει να επαναληφθεί αν η χρώση παρεκκλίνει. Τα φατνία εξετάζονται κατά δύο κάθετες διαμέτρους και κατά την περίμετρό τους. Όσον αφορά τα δείγματα που δεν δείχνουν καθόλου κύτταρα ή δείχνουν μικρό αριθμό κυττάρων, πρέπει να παρατηρηθούν τουλάχιστον 40 πεδία μικροσκοπίου.

5.3.2. Εξετάζεται εάν υπάρχουν λαμπρώς φθορίζοντα κύτταρα με τη χαρακτηριστική μορφολογία του *C. m.* subsp. *sepedonicus* στα φατνία δοκιμής των αντικειμενοφόρων δοκιμής (βλέπε ιστοχώρο http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Η ένταση του φθορισμού πρέπει να είναι ισοδύναμη ή καλύτερη από αυτήν της χρώσης των θετικών μαρτύρων. Κύτταρα με ατελή χρώση ή με ασθενή φθορισμό δεν πρέπει να λαμβάνονται υπόψη.

5.3.3. Εάν υπάρχει υπόνοια μόλυνσης, η δοκιμή πρέπει να επαναληφθεί. Αυτό μπορεί να ισχύει εάν όλες οι αντικειμενοφόροι μιας παρτίδας δείχνουν θετικά κύτταρα

λόγω μόλυνσης του ρυθμιστικού διαλύματος ή εάν βρεθούν θετικά κύτταρα (εκτός των φατνίων της αντικειμενοφόρου) στην επικάλυψη της αντικειμενοφόρου.

5.3.4. Υπάρχουν διάφορα προβλήματα σύμφυτα με την εξειδίκευση της δοκιμής FISH. Τα ιζήματα των κώνων από τα σημεία πρόσφυσης του στολονίου και των τμημάτων των στελεχών ενδέχεται να περιέχουν αν και λιγότερο συχνά απ'ότι στη δοκιμή IF πληθυσμούς φθοριζόντων κυττάρων μη τυπικής μορφολογίας καθώς και μη ειδικώς αντιδρώντα σαπροφυτικά βακτήρια όμοιου μεγέθους και μορφολογίας με το *C. m. sepedonicus*.

5.3.5. Λαμβάνονται υπόψη μόνον τα φθορίζοντα κύτταρα με τυπικό μέγεθος και μορφολογία, βλέπε 5.3.2.

5.3.6. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων των δοκιμών FISH

(i) Έγκυρα αποτελέσματα από τη δοκιμή FISH παρέχονται όταν, χρησιμοποιώντας φίλτρο FITC, παρατηρούνται κύτταρα που είναι χρωσμένα με λαμπρό φθορίζον πράσινο χρώμα και διαθέτουν το τυπικό μέγεθος και μορφολογία του *C.m.* subsp. *sepedonicus* και όταν, χρησιμοποιώντας φίλτρο ροδαμίνης, παρατηρούνται κύτταρα χρωσμένα με λαμπρό φθορίζον κόκκινο χρώμα σε όλους τους θετικούς μάρτυρες και σε κανέναν αρνητικό μάρτυρα. Εάν σε ένα δείγμα εντοπίζονται λαμπρώς φθορίζοντα κύτταρα με χαρακτηριστική μορφολογία, εκτιμάται ο μέσος αριθμός τυπικών κυττάρων ανά πεδίο μικροσκοπίου και υπολογίζεται ο αριθμός των τυπικών κυττάρων ανά ml του αναδιαλυμένου ιζήματος (προσάρτημα 4). Τα δείγματα με τουλάχιστον 5×10^3 τυπικά κύτταρα ανά ml αναδιαλυμένου ιζήματος θεωρούνται ενδεχομένως μολυσμένα. Απαιτείται η διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών. Τα δείγματα με λιγότερα από 5×10^3 τυπικά κύτταρα ανά ml αναδιαλυμένου ιζήματος θεωρούνται αρνητικά.

(ii) Η δοκιμή FISH είναι αρνητική εάν κύτταρα χρωσμένα με λαμπρό φθορίζον κόκκινο χρώμα, τυπικό μέγεθος και μορφολογία του *C. m.* subsp. *sepedonicus*, δεν παρατηρούνται με φίλτρο ροδαμίνης, υπό την προϋπόθεση ότι τυπικά κύτταρα χρωσμένα με λαμπρό φθορίζον κόκκινο χρώμα παρατηρούνται στα παρασκευάσματα θετικών μαρτύρων όταν χρησιμοποιείται φίλτρο ροδαμίνης.

6. ΔΟΚΙΜΗ PCR

Αρχές

Όταν η δοκιμή PCR χρησιμοποιείται ως αρχική δοκιμή διαλογής και έχει θετικά αποτελέσματα, πρέπει να πραγματοποιηθεί η δοκιμή IF ως δεύτερη υποχρεωτική δοκιμή διαλογής. Όταν η δοκιμή PCR χρησιμοποιείται ως δεύτερη δοκιμή διαλογής και έχει θετικά αποτελέσματα, απαιτείται διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών σύμφωνα με το διάγραμμα ροής για την ολοκλήρωση της διάγνωσης.

Η πλήρης αξιοποίηση της μεθόδου αυτής ως αρχικής δοκιμής διαλογής συνιστάται μόνον όταν έχει αποκτηθεί εξειδικευμένη εμπειρία.

Σημείωση:

Οι προκαταρκτικές δοκιμές με τη μέθοδο αυτή πρέπει να επιτρέπουν την αναπαραγώγιμη ανίχνευση τουλάχιστον 103 έως 104 κυττάρων του C. m. subsp. sepedonicus ανά ml που προστίθεται σε εκχυλίσματα δειγμάτων που προηγούμενως έδειξαν αρνητικά αποτελέσματα. Μπορεί να χρειασθούν πειράματα αριστοποίησης για την επίτευξη των μέγιστων επιπέδων ευαισθησίας και εξειδίκευσης σε όλα τα εργαστήρια.

Χρησιμοποιούνται επικυρωμένα αντιδραστήρια και πρωτόκολλα PCR. Επιλέγεται κατά προτίμηση μέθοδος με εσωτερικό μάρτυρα.

Λαμβάνονται οι κατάλληλες προφυλάξεις ώστε να αποφευχθεί η μόλυνση του δείγματος με DNA στόχο. Η δοκιμή PCR θα πρέπει να πραγματοποιείται από πεπειραμένους τεχνικούς, σε καθιερωμένα εργαστήρια μοριακής βιολογίας, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα μόλυνσης με DNA στόχο.

Οι αρνητικοί μάρτυρες πρέπει πάντοτε (εξαγωγή DNA και PCR) να χειρίζονται ως τελικό δείγμα στη διαδικασία, έτσι ώστε να καθίσταται φανερή ενδεχόμενη μεταφορά DNA.

Στη δοκιμή PCR πρέπει να περιλαμβάνονται οι ακόλουθοι αρνητικοί μάρτυρες:

— Εκχύλισμα δείγματος που προηγουμένως ήταν αρνητικό στη δοκιμή για το *C. m.* subsp. *sepedonicus*,

— μάρτυρες ρυθμιστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή του βακτηρίου και του DNA από το δείγμα,

— μείγμα αντίδρασης PCR.

Πρέπει να περιλαμβάνονται οι ακόλουθοι θετικοί μάρτυρες:

— Κατάλληλες ποσότητες αναδιαλυμένων ιζημάτων στις οποίες έχει προστεθεί το *C. m.* subsp. *sepedonicus* (για την παρασκευή βλέπε προσάρτημα 2),

— αιώρημα 106 κυττάρων ανά ml νερού παθογόνου απομόνωσης του *C. m.* subsp. *sepedonicus* (π.χ. NCPPB 2140 ή NCPPB 4053),

— εάν είναι δυνατόν, χρησιμοποιείται επίσης DNA από δείγματα θετικών μαρτύρων κατά τη διενέργεια της δοκιμής PCR.

Για την αποφυγή πιθανής μόλυνσης παρασκευάζονται θετικοί μάρτυρες σε ξεχωριστό περιβάλλον από τα δείγματα προς δοκιμή.

Τα εκχυλίσματα δείγματος πρέπει να έχουν απαλλαγεί στο μέγιστο δυνατό βαθμό από χώματα. Για το λόγο αυτό, συστήνεται σε ορισμένες περιπτώσεις να προετοιμάζονται οι εξαγωγές από πλυμένες πατάτες εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν πρωτόκολλα PCR.

6.1. Μέθοδοι καθαρισμού DNA

Χρησιμοποιούνται δείγματα θετικών και αρνητικών μαρτύρων όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Η παρασκευή του υλικού των μαρτύρων γίνεται με τον ίδιο τρόπο όπως εκείνη του ή των δειγμάτων.

Υπάρχουν διάφορες διαθέσιμες μέθοδοι για τον καθαρισμό του DNA στόχου από σύνθετα υποστρώματα δειγμάτων, απομακρύνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τους παρεμποδιστές της PCR και άλλων ενζυματικών αντιδράσεων και συγκεντρώνοντας το DNA στόχο στο εκχύλισμα δείγματος.

Η ακόλουθη μέθοδος έχει βελτιστοποιηθεί με σκοπό τη χρήση με την επικυρωμένη μέθοδο PCR που περιγράφεται στο προσάρτημα 6.

6.1.(α) Μέθοδος Pastrik (2000):

1. Προστίθενται με σιφώνιο 220 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) σε σωλήνα Eppendorf 1,5 ml.

2. Προστίθενται 100 μl εκχυλίσματος δείγματος και τοποθετούνται σε θερμικό μπλοκ ή υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 95 °C για 10 λεπτά.

3. Ο σωλήνας τοποθετείται σε πάγο για 5 λεπτά.

4. Προστίθενται 80 μl πυκνού διαλύματος λυσοζύμης (50 mg λυσοζύμη ανά ml σε 10 mM Tris HCl, pH 8,0) και επωάζονται στους 37 °C για 30 λεπτά.

5. Προστίθενται 220 μl διαλύματος A Easy DNA® (Invitrogen), αναμειγνύονται καλά σε συσκευή vortex και επωάζονται στους 65 °C για 30 λεπτά.

6. Προστίθενται 100 μl διαλύματος B Easy DNA® (Invitrogen), αναμειγνύονται με ένταση σε συσκευή vortex έως ότου το ίζημα να ρέει ελεύθερα στο σωλήνα και το δείγμα να είναι ομοιόμορφα ιξώδες.

7. Προστίθενται 500 μl χλωροφόρμιου και αναμειγνύουμε με στροβιλισμό (vortex) έως ότου μειωθεί το ιξώδες και το μείγμα είναι ομοιογενές.

8. Ακολουθεί φυγοκέντριση σε 15 000 g για 20 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C για το διαχωρισμό των φάσεων και τη δημιουργία της ενδιάμεσης φάσης.

9. Η άνω φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα Eppendorf.

10. Προστίθεται 1 ml από 100 % αιθανόλη (– 20 °C), αναμειγνύεται με στροβιλισμό (vortex) για σύντομο χρονικό διάστημα και επωάζεται σε πάγο για 10 λεπτά.

11. Φυγοκεντρείται σε 15 000 g για 20 λεπτά στους 4 °C και απομακρύνεται η αιθανόλη από το ίζημα.

12. Προστίθενται 500 μl 80 % αιθανόλης (– 20 °C) και αναμειγνύουμε αναποδογυρίζοντας το σωλήνα.

13. Ακολουθεί φυγοκέντριση σε 15 000 g για 10 λεπτά στους 4 °C διατηρείται το ίζημα και απομακρύνεται η αιθανόλη.

14. Αφήνουμε το ίζημα να στεγνώσει στον αέρα ή σε DNA Speed Vac.

15. Το ίζημα αναδιαλύεται σε 100 μl αποστειρωμένου UPW και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 20 λεπτά.

16. Αποθηκεύεται στους – 20 °C έως ότου χρειασθεί να χρησιμοποιηθεί για την PCR.

17. Καθιζάνεται με φυγοκέντριση οιοδήποτε λευκό ίζημα και χρησιμοποιούνται 5 μl του υπερκείμενου υγρού που περιέχει DNA για την PCR.

6.1.(β) Άλλες μέθοδοι

Είναι δυνατόν να εφαρμοσθούν άλλες μέθοδοι εξαγωγής DNA (π.χ. Qiagen DNeasy Plant Kit) με την προϋπόθεση ότι έχει αποδειχθεί πως είναι εξίσου αποτελεσματικές για τον καθαρισμό DNA από δείγματα μαρτύρων που περιέχουν 10^3 έως 10^4 κύτταρα παθογόνου ανά ml.

6.2. **PCR**

6.2.1. Τα προς δοκιμή πρότυπα και εκείνα των μαρτύρων παρασκευάζονται για την PCR σύμφωνα με το επικυρωμένο πρωτόκολλο (προσάρτημα 6). Παρασκευάζεται μια δεκαδική αραίωση εκχυλίσματος DNA δείγματος (1:10 σε UPW).

6.2.2. Παρασκευάζεται το κατάλληλο μείγμα αντίδρασης PCR σε περιβάλλον απαλλαγμένο από μολύνσεις σύμφωνα με το δημοσιευμένο πρωτόκολλο (προσάρτημα 6). Το επικυρωμένο πρωτόκολλο PCR είναι μια πολλαπλή αντίδραση που ενσωματώνει επίσης έναν εσωτερικό μάρτυρα PCR.

6.2.3. Προσθέτουμε 5 μl εκχυλίσματος DNA ανά 25 μl αντίδρασης PCR σε αποστειρωμένους σωλήνες PCR.

6.2.4. Ενσωματώνεται δείγμα αρνητικού μάρτυρα που περιέχει μόνον μείγμα αντίδρασης PCR και προστίθεται η ίδια πηγή UPW που χρησιμοποιήθηκε στο μείγμα PCR αντί για δείγμα.

6.2.5. Οι σωλήνες τοποθετούνται στον ίδιο θερμικό κυκλοποιητή που χρησιμοποιήθηκε στην προκαταρκτική δοκιμή και αρχίζει το καταλλήλως βελτιωμένο πρόγραμμα PCR (προσάρτημα 6).

6.3. **Ανάλυση του προϊόντος PCR**

6.3.1. Τα αμπλικόνια της PCR αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Τοποθετούνται για μετακίνηση τουλάχιστον 12 μl μείγματος αντίδρασης ενισχυμένου DNA από κάθε δείγμα αναμεμειγμένα με 3 μl ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης (προσάρτημα 6) σε 2,0 % (β/ο) πηκτές αγαρόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα τρις-Οξικού-EDTA (TAE) (προσάρτημα 6) σε 5-8 V ανά cm. Χρησιμοποιείται ένας κατάλληλος δείκτης μοριακών βαρών (MW) DNA, π.χ. 100 bp ladder.

6.3.2. Οι ζώνες DNA α6.3.2. Οι ζώνες DNA αποκαλύπτονται διά χρώσεως σε βρωμιούχο αιθίδιο (0,5 mg ανά L) για 30-45 λεπτά λαμβάνοντας τις απαραίτητες *προφυλάξεις κατά το χειρισμό αυτού του μεταλλαξιογόνου.*

6.3.3. Η χρωσμένη πηκτή εξετάζεται υπό υπεριώδη ακτινοβολία μικρού μήκους κύματος (π.χ. λ = 302 nm) για ενισχυμένα προϊόντα PCR του αναμενόμενου μεγέθους (προσάρτημα 6) και σημειώνονται τα αποτελέσματα.

6.3.4. Για όλα τα νέα ευρήματα/περιπτώσεις, επιβεβαιώνεται η αυθεντικότητα του αμπλικονίου PCR με την πραγματοποίηση ανάλυσης με ένζυμο περιορισμού σε δείγμα του εναπομείναντος ενισχυμένου DNA με επώαση στη βέλτιστη θερμοκρασία και χρόνο με το κατάλληλο ένζυμο και ρυθμιστικό διάλυμα (βλέπε προσάρτημα 6). Τα τμήματα που υπέστησαν πέψη αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης όπως προηγουμένως και παρατηρείται υπό υπεριώδη ακτινοβολία το χαρακτηριστικό πρότυπο του θραύσματος περιορισμού μετά τη χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο και συγκρίνεται με το θετικό μάρτυρα που δεν υπέστη πέψη και το θετικό μάρτυρα που υπέστη πέψη.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων των δοκιμών PCR:

Η δοκιμή PCR είναι αρνητική εάν το αναμενόμενου μεγέθους, ειδικό για το *C. m.* subsp. *sepedonicus* αμπλικόνιο PCR δεν ανιχνευθεί για το εν λόγω δείγμα αλλά ανιχνευθεί για όλα τα δείγματα θετικών μαρτύρων (στην περίπτωση πολλαπλής PCR με εκκινητές εσωτερικών μαρτύρων ειδικούς για φυτά: πρέπει να ενισχυθεί ένα δεύτερο, αναμενόμενου μεγέθους, προϊόν PCR με το εν λόγω δείγμα).

Η δοκιμή PCR είναι θετική εάν ανιχνευθεί το ειδικό για το *C. m.* subsp. *sepedonicus* αμπλικόνιο της PCR στο αναμενόμενο μέγεθος και πρότυπο περιορισμού (όταν αυτό απαιτείται), εφόσον δεν έχει ενισχυθεί από οιοδήποτε εκ των δειγμάτων αρνητικών μαρτύρων. Η αξιόπιστη επιβεβαίωση τυχόν θετικού αποτελέσματος είναι δυνατόν να επιτευχθεί επίσης με την επανάληψη της δοκιμής με δεύτερο σετ εκκινητών PCR (ενότητα 9.3).

Σημείωση:

Ενδέχεται να υπάρξουν υπόνοιες για παρεμπόδιση της PCR εάν το αναμενόμενο αμπλικόνιο αποκτηθεί από δείγμα θετικού μάρτυρα που περιέχει C. m. subsp. sepedonicus σε ύδωρ αλλά προκύψουν αρνητικά αποτελέσματα από τους θετικούς μάρτυρες με C. m. subsp. sepedonicus σε εκχύλισμα πατάτας. Στα πρωτόκολλα πολλαπλής PCR με εσωτερικούς ελέγχους PCR, υπάρχει ένδειξη για παρεμπόδιση της αντίδρασης εάν δεν προκύψει κανένα από τα δύο αμπλικόνια.

Υπάρχει υπόνοια για επιμόλυνση εάν το αναμενόμενο αμπλικόνιο προκύψει από έναν ή περισσότερους αρνητικούς μάρτυρες.

7. ΒΙΟΔΟΚΙΜΗ

Σημείωση:

Οι προκαταρκτικές δοκιμές με τη μέθοδο αυτή θα πρέπει να καθιστούν δυνατή την αναπαραγώγιμη ανίχνευση 103 έως 104 μονάδων του C. m. subsp. sepedonicus που σχηματίζουν αποικίες ανά ml που προστίθεται σε εκχυλίσματα δειγμάτων που προηγουμένως ήταν αρνητικά στις δοκιμές (για την παρασκευή βλέπε προσάρτημα 2).

Η ύψιστη ευαισθησία της ανίχνευσης μπορεί να αναμένεται όταν χρησιμοποιείται εκχύλισμα δείγματος που έχει μόλις παρασκευασθεί και υπάρχουν οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης. Ωστόσο, η μέθοδος μπορεί να εφαρμοσθεί επιτυχώς σε εκχυλίσματα που έχουν αποθηκευθεί σε γλυκερίνη στους – 68 έως – 86 °C.

Ορισμένες ποικιλίες φυτών μελιτζάνας αποτελούν εξαιρετικό υπόστρωμα εκλεκτικού εμπλουτισμού για την ανάπτυξη του *C. m.* subsp. *sepedonicus* ακόμη και ελλείψει συμπτωμάτων και αποτελούν εξαιρετική δοκιμή επιβεβαίωσης στον ξενιστή.

Οι συνθήκες ανάπτυξης πρέπει να είναι βέλτιστες έτσι ώστε να είναι μειωμένος ο κίνδυνος λανθασμένων αρνητικών αποτελεσμάτων της δοκιμής.

Για τον τρόπο καλλιέργειας, βλέπε προσάρτημα 8.

7.1. Διανέμεται το σύνολο της εναπομείνασας κατάλληλης ποσότητας δοκιμής στο αναδιαλυμένο ίζημα της ενότητας 3.1.6 ή 3.2.5 μεταξύ φυτών μελιτζάνας με μία από τις μεθόδους που δίδονται παρακάτω (7.3 ή 7.4). Χρησιμοποιούνται μόνον τα φυτά στο στάδιο του 2-3 πραγματικού φύλλου έως την πλήρη ανάπτυξη του τρίτου πραγματικού φύλλου. Για την εξασφάλιση της πλήρους χρήσης του αναδιαλυμένου διαλύματος καθώς και της αποτελεσματικής μόλυνσης, απαιτούνται 15-25 φυτά μελιτζάνας ανά δείγμα για τις διαδικασίες που περιγράφονται παρακάτω.

7.2. Τα φυτά μελιτζάνας δεν ποτίζονται για 1 έως 2 ημέρες πριν από τη μόλυνση προκειμένου να μειωθεί η πίεση σπαργής.

7.3. Μόλυνση σχισμής

7.3.1. Το φυτό συγκρατείται μεταξύ δύο δακτύλων και μια σταγόνα (περίπου 5-10 μl) του αιωρήματος του ιζήματος τοποθετείται με σιφώνιο επί του στελέχους, μεταξύ των κοτυληδόνων και του πρώτου φύλλου.

7.3.2. Με ένα αποστειρωμένο νυστέρι, πραγματοποιείται στο στέλεχος μια διαγώνια τομή, μήκους 1,0 cm και βάθους ίσου προς τα 2/3 περίπου της διαμέτρου του στελέχους, αρχίζοντας από τη σταγόνα του ιζήματος.

7.3.3. Η τομή καλύπτεται με αποστειρωμένη βαζελίνη από μια σύριγγα.

7.4. Μόλυνση με σύριγγα

Τα στελέχη των φυτών μελιτζάνας μολύνονται ακριβώς πάνω από τις κοτυληδόνες με μια σύριγγα με υποδερμική βελόνα (τουλάχιστον 23 G). Το δείγμα κατανέμεται μεταξύ των φυτών μελιτζάνας.

7.5. Ως θετικοί μάρτυρες, μολύνονται 5 φυτά με υδατικό αιώρημα 10^5 έως 10^6 κυττάρων ανά ml γνωστής καλλιέργειας του *C. m.* subsp. *sepedonicus* και, όπου είναι δυνατόν, με φυσικώς μολυσμένους ιστούς κονδύλων (βλέπε ενότητα 4) με την ίδια μέθοδο μόλυνσης (7.3 ή 7.4).

7.6. Ως αρνητικοί μάρτυρες, μολύνονται 5 φυτά με αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα ιζήματος με την ίδια μέθοδο μόλυνσης (7.3 ή 7.4).

7.7. Τα φυτά επωάζονται σε εγκαταστάσεις καραντίνας για χρονικό διάστημα μέχρι 4 εβδομάδων σε θερμοκρασία 18-24 °C. Τα φυτά επωάζονται με επαρκές φως και υψηλή υγρασία (70-80 %) και ποτίζονται για την αποφυγή υπεράρδευσης ή μάρανσης λόγω έλλειψης νερού. Τα κύτταρα του *C. m.* ssp. *sepedonicus* νεκρώνονται σε θερμοκρασίες άνω των 30 °C και η βέλτιστη θερμοκρασία είναι 21°C. Για την αποφυγή της επιμόλυνσης, επωάζονται τα φυτά θετικών και αρνητικών μαρτύρων σε σαφώς διαχωρισμένους πάγκους σε θερμοκήπιο ή θάλαμο ανάπτυξης ή, εάν ο χώρος είναι περιορισμένος, εξασφαλίζεται ο αυστηρός διαχωρισμός μεταξύ των χειρισμών. Εάν πρέπει να επωασθούν φυτά για διαφορετικά δείγματα το ένα κοντά στο άλλο, διαχωρίζονται με κατάλληλα παραπετάσματα. Κατά τη λίπανση, το πότισμα, την επιθεώρηση και οιουσδήποτε άλλους χειρισμούς πρέπει να δίδεται εξαιρετική προσοχή ώστε να αποφεύγεται τυχόν επιμόλυνση. Είναι σημαντικό να διατηρούνται τα θερμοκήπια και οι θάλαμοι ανάπτυξης απαλλαγμένα από όλα τα έντομα εχθρούς καθώς μπορεί να μεταδίδουν το βακτήριο από δείγμα σε δείγμα.

7.8. Ελέγχονται τακτικά για συμπτώματα μετά από μία εβδομάδα. Μετράται ο αριθμός των φυτών που παρουσιάζουν συμπτώματα. Στα φυτά μελιτζάνας, το *C. m.* subsp. *sepedonicus* προκαλεί μαρασμό των φύλλων, ο οποίος μπορεί να αρχίσει ως περιμετρική ή μεσονεύρια έλλειψη σπαργής. Οι μαραμένοι ιστοί ενδέχεται να είναι αρχικά βαθυπράσινοι ή μωσαϊκόμορφοι, αλλά στη συνέχεια γίνονται χλωρωτικοί πριν νεκρωθούν. Συχνά, οι μαραμένοι ιστοί μεταξύ των νευρώσεων έχουν λιπώδη και βρεγμένη εμφάνιση. Η περίμετρος των νεκρωτικών ιστών είναι συχνά έντονα κίτρινη. Τα φυτά δεν νεκρώνονται πάντοτε· όσο μεγαλύτερη είναι η περίοδος πριν την εμφάνιση των συμπτωμάτων, τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα επιβίωσης. Τα φυτά είναι δυνατόν να επιζήσουν της μόλυνσης. Τα νεαρά φυτά μελιτζάνας είναι πολύ πιο ευαίσθητα σε χαμηλούς πληθυσμούς του *C. m.* subsp. *sepedonicus* από τα ηλικιωμένα φυτά και εξ'αυτού προκύπτει η αναγκαιότης χρησιμοποίησης φυτών που είναι στο στάδιο των 3 πραγματικών φύλλων ή λίγο πριν απ' αυτό.

Μαρασμοί μπορεί επίσης να προκαλούνται από πληθυσμούς άλλων βακτηρίων ή μυκήτων που υπάρχουν στο ίζημα ιστών κονδύλων. Αυτά περιλαμβάνουν τα *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* και *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *Erwinia chrysanthemi*, *Phoma exigua* var. *foveata*, καθώς και μεγάλοι πληθυσμοί σαπροφυτικών βακτηρίων. Ιδιαίτερα το *Erwinia chrysanthemi* μπορεί να προκαλέσει συμπτώματα των φύλλων και μάρανση που είναι σε μεγάλο βαθμό όμοια με τα συμπτώματα του C. m.ssp. *sepedonicus*. Η μόνη διαφορά είναι η μελάνωση των στελεχών στην περίπτωση των μολύνσεων από το *Erwinia chrysanthemi*. Άλλοι μαρασμοί μπορεί να διακριθούν από εκείνους που προκαλούνται από το *C. m.* subsp. *sepedonicus* λόγω του ότι μαραίνονται γρήγορα ολόκληρα φύλλα ή ολόκληρα φυτά. Είναι επίσης δυνατόν να παρασκευασθεί μια χρώση κατά Gram: η εν λόγω δοκιμή θα διαφοροποιήσει το *C. m.* subsp. *sepedonicus* από το *Erwinia* spp.

7.9. Μόλις παρατηρηθούν συμπτώματα στα φυτά μελιτζάνας, πρέπει να πραγματοποιηθεί εκ νέου απομόνωση, χρησιμοποιώντας τα τμήματα του μαραμένου ιστού των φύλλων ή του ιστού των στελεχών των φυτών (βλέπε 3.1.3 για τη διαβροχή των ιστών). Η επιφάνεια των φύλλων και των στελεχών των φυτών μελιτζάνας απολυμαίνεται με σφουγγάρι εμποτισμένο με 70 % αιθανόλη. Πραγματοποιείται δοκιμή IF ή PCR στον χυμό των φυτών μελιτζάνας και απομονώνεται σε κατάλληλο (εκλεκτικό) υπόστρωμα (βλέπε ενότητα 8). Μπορεί επίσης να παρασκευασθεί μια χρώση κατά Gram (προσάρτημα 9). Ταυτοποιούνται οι καθαρισμένες καλλιέργειες του πιθανού *C. m.* subsp. *sepedonicus* και επιβεβαιώνεται η παθογένεια (βλέπε ενότητες 9 και 10).

7.10. Υπό ορισμένες συνθήκες, ιδίως δε όταν οι συνθήκες ανάπτυξης δεν είναι άριστες, είναι δυνατόν για το *C. m.* subsp. *sepedonicus* να υπάρχει ως λανθάνουσα μόλυνση στα φυτά μελιτζάνας ακόμη και μετά από επώαση 4 εβδομάδων. Εάν δεν παρατηρηθούν συμπτώματα μετά από 4 εβδομάδες, πραγματοποιείται δοκιμή IF/PCR σε σύνθετο δείγμα τμημάτων στελεχών μήκους 1 cm από κάθε φυτό δοκιμής που έχουν ληφθεί πάνω από το σημείο μόλυνσης. Εάν η δοκιμή είναι θετική, πρέπει να πραγματοποιηθεί εκ νέου απομόνωση σε κατάλληλο (εκλεκτικό) υπόστρωμα σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην ενότητα 8. Ταυτοποιούνται οι καθαρισμένες καλλιέργειες πιθανού *C. m.* subsp. *sepedonicus* και επιβεβαιώνεται η παθογένεια (βλέπε ενότητες 9 και 10).

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων της βιοδοκιμής

Τα αποτελέσματα της βιοδοκιμής είναι έγκυρα όταν τα φυτά του θετικού μάρτυρα εμφανίζουν τυπικά συμπτώματα, τα βακτήρια είναι δυνατόν να απομονωθούν εκ νέου από τα εν λόγω φυτά και δεν εντοπίζονται συμπτώματα στους αρνητικούς μάρτυρες.

Η βιοδοκιμή είναι αρνητική εάν τα φυτά της δοκιμής δεν έχουν προσβληθεί από το *C. m.* subsp. *sepedonicus* και εάν το *C. m.* subsp. *sepedonicus* ανιχνεύεται στους θετικούς μάρτυρες.

Η βιοδοκιμή είναι θετική εάν τα φυτά δοκιμής είναι προσβεβλημένα από το *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

8. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ *C. M.* SUBSP. *SEPEDONICUS*

Σημείωση:

Η διάγνωση ολοκληρώνεται μόνον εάν το C. m. subsp. sepedonicus έχει απομονωθεί, στη συνέχεια ταυτοποιηθεί (βλέπε ενότητα 9) και επιβεβαιωθεί μέσω δοκιμής παθογένειας (ενότητα 10). Μολονότι το C. m. subsp. sepedonicus είναι απαιτητικός οργανισμός, είναι δυνατόν να απομονωθεί από ιστούς που παρουσιάζουν συμπτώματα.

Ωστόσο, το βακτήριο αυτό μπορεί να καλυφθεί από ταχέως αναπτυσσόμενα σαπροφυτικά βακτήρια και, για το λόγο αυτό, είναι δύσκολη η απομόνωση απευθείας από το ίζημα ιστών κονδύλου ή στελέχους (ενότητα 3.1.6 ή 3.2.5). Με εκλεκτικό υπόστρωμα και την κατάλληλη αραίωση του αναδιαλυμένου ιζήματος από τους κώνους που έχουν αφαιρεθεί από τα σημεία πρόσφυσης των στολονίων της πατάτας ή τα στελέχη είναι δυνατή η άμεση απομόνωση του *C. m.*subsp. *sepedonicus*.

Οι απομονώσεις πραγματοποιούνται από όλα τα τμήματα συμπτωματικών κονδύλων ή στελεχών πατάτας καθώς και από φυτά μελιτζάνας στα οποία δεν παρατηρήθηκαν συμπτώματα αλλά η δοκιμή IF/PCR σύνθετου δείγματος είχε θετικά αποτελέσματα (βλέπε ενότητα 7.10). Όταν είναι απαραίτητο, η διαλυτοποίηση των στελεχών των φυτών μελιτζάνας πρέπει να γίνεται όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.1.3.

Ως θετικοί μάρτυρες, παρασκευάζονται δεκαδικές αραιώσεις από αιώρημα 10^6 cfu ανά ml του *C. m.* subsp. *sepedonicus* (π.χ. NCPPB 4053 ή PD 406). Για την αποφυγή ενδεχόμενης επιμόλυνσης, παρασκευάζονται θετικοί μάρτυρες πλήρως διαχωρισμένοι από τα δείγματα προς δοκιμή.

Η καταλληλότητα κάθε νέας παρτίδας εκλεκτικού υποστρώματος όσον αφορά την ανάπτυξη του παθογόνου πρέπει να ελέγχεται πριν χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο των συνήθων δειγμάτων.

Η δοκιμή του υλικού των μαρτύρων γίνεται με τον ίδιο τρόπο όπως αυτή του ή των δειγμάτων.

8.1. Εκλεκτική απομόνωση επί στερεού υποστρώματος

8.1.1. Από 100 μl κατάλληλης ποσότητας δείγματος αναδιαλυμένου ιζήματος πατάτας ή χυμού φυτών μελιτζάνας παρασκευάζονται 10πλές αραιώσεις σε ρυθμιστικό διάλυμα ιζήματος (προσάρτημα 3).

8.1.2. Η απομόνωση από μη αραιωμένο ίζημα πατάτας αποτυγχάνει συνήθως λόγω της συνήθειας απαιτητικής ανάπτυξης του Cms και του ανταγωνισμού από τα σαπρόφυτα. Λόγω του ότι το βακτήριο υπάρχει συνήθως σε μεγάλους πληθυσμούς στους προσβεβλημένους ιστούς, τα σαπρόφυτα μπορούν συνήθως να αραιωθούν ενώ το παθογόνο παραμένει. Για το λόγο αυτό, συνιστάται να εξαπλωθούν, χρησιμοποιώντας εξαπλωτήρες [ράβδοι χόκεϋ (hockey sticks)] και την τεχνική εξάπλωσης σε τρυβλία (spread plate), 100 μl από κάθε δείγμα, σε αραιώσεις 1/100 έως 1/10 000, σε υπόστρωμα MTNA ή NCP-88 (προσάρτημα 5) (εάν χρησιμοποιούνται τρυβλία petri διαμέτρου 90 mm – προσαρμόζεται ο όγκο για εναλλακτικά μεγέθη τρυβλίων).

Σημείωση:

Μια εναλλακτική στρατηγική είναι η εξάπλώση της αρχικής ποσότητας 100 μl ιζήματος πατάτας επί ενός πρώτου τρυβλίου agar με έναν εξαπλωτήρα. Στη συνέχεια μεταφέρεται ο εξαπλωτήρας σε ένα δεύτερο τρυβλίο agar, εξαπλώνοντας οιοδήποτε υπόλειμμα έχει μείνει στον εξαπλωτήρα· η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται, τέλος, σε ένα τρίτο τρυβλίο, δίδοντας κατ' αυτόν τον τρόπο αποτέλεσμα αραιώσεως επί του υποστρώματος μέσω του εξαπλωτήρα.

8.1.3. Οι πλάκες επωάζονται στο σκοτάδι στους 21-23 °C.

8.1.4. Οι αρχικές εξετάσεις των τρυβλίων, συμπεριλαμβανομένων, όσον αφορά τα τρυβλία των μαρτύρων, των μετρήσεων των αποικιών που είναι όμοιες με το *C. m.* subsp. *sepedonicus*, πραγματοποιούνται μετά από 3 ημέρες, ενώ περαιτέρω μετρήσεις γίνονται μετά από 5, 7 και τελικά 10 ημέρες.

8.2. Καθαρισμός ύποπτων αποικιών

Σημείωση:

Η υποκαλλιέργεια αποικιών που μοιάζουν με C. m. subsp. sepedonicus πρέπει να διεξάγεται σε υπόστρωμα YGM για μόλυνση φυτών μελιτζάνας ή/και ακόλουθη ταυτοποίηση· αυτό πρέπει να γίνει προτού μεγαλώσει υπερβολικά η ανάπτυξη στα τρυβλία, δηλαδή κατά προτίμηση μετά από 3-5 ημέρες.

8.2.1. Οι αποικίες που μοιάζουν με εκείνες του *C. m.* subsp. *sepedonicus* διασπείρονται γραμμωτά σε ένα από τα ακόλουθα θρεπτικά υλικά (η σύνθεση των υποστρωμάτων δίδεται στο προσάρτημα 5):

nutrient dextrose agar (μόνον για υποκαλλιέργεια),

yeast peptone glucose agar,

yeast extract mineral salts agar.

Επωάζουμε στους 21 °C - 24 °C μέχρι 10 ημέρες.

Το *C. m.* subsp. *sepedonicus* αναπτύσσεται αργά, συνήθως παράγοντας αποικίες χρώματος κρεμ, υπερυψωμένες, μεγέθους μύτης καρφίτσας μετά από δέκα ημέρες. (Φωτογραφίες τυπικών αποικιών του *C. m.* subsp. *sepedonicus*, βλέπε ιστοχώρο: http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

8.2.2. Επαναδιασπείρονται γραμμωτά για να εξασφαλιστεί η καθαρότητα.

Οι ρυθμοί ανάπτυξης βελτιώνονται με υποκαλλιέργειες. Οι τυπικές αποικίες είναι χρώματος κρεμ-λευκού ή ελεφαντίνου, ενδεχομένως κίτρινου, στρογγυλές, λείες, υπερυψωμένες, θολωτές, βλεννώδεις-ρευστές, με πλήρη περίμετρο και με διάμετρό 1-3 mm συνήθως.

Μια απλή χρώση κατά Gram (προσάρτημα 9) μπορεί να συμβάλει στην επιλογή των αποικιών για τη διενέργεια περαιτέρω δοκιμών,

8.2.3. Ταυτοποιούνται οι πιθανές καλλιέργειες (βλέπε ενότητα 9) και πραγματοποιείται δοκιμή παθογένειας (βλέπε ενότητα 10).

9. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

Ταυτοποιούνται οι καθαρές καλλιέργειες των πιθανών απομονώσεων του *C. m.* subsp. *sepedonicus* χρησιμοποιώντας τουλάχιστον δύο από τις ακόλουθες δοκιμές που βασίζονται σε διαφορετικές βιολογικές αρχές.

Για κάθε δοκιμή που πραγματοποιείται, συμπεριλαμβάνονται γνωστά στελέχη αναφοράς όπου ενδείκνυται.

9.1. Θρεπτικές και ενζυματικές δοκιμές ταυτοποίησης

Προσδιορίζονται οι ακόλουθες φαινοτυπικές ιδιότητες που παρουσιάζει ή όχι εν γένει το *C. m.* subsp. *sepedonicus*, σύμφωνα με τις μεθόδους των Lelliott και Stead (1987), Klement *et al.* (1990), Schaad (2001), Anonymous (1987).

Όλα τα υποστρώματα πρέπει να επωάζονται στους 21 °C και να εξετάζονται ύστερα από έξι ημέρες. Εάν το βακτήριο δεν έχει αναπτυχθεί, η επώαση συνεχίζεται για 20 ημέρες συνολικά.

Όλες οι δοκιμές πρέπει να περιλαμβάνουν ένα γνωστό στέλεχος του *C. m.* subsp. *sepedonicus* ως μάρτυρα. Οι θρεπτικές και φυσιολογικές δοκιμές πρέπει να διενεργούνται με μόλυσμα από υποκαλλιέργειες σε nutrient agar. Οι μορφολογικές συγκρίσεις πρέπει να γίνονται από καλλιέργειες σε nutrient dextrose agar.

Δοκιμές	*Αναμενόμενο αποτέλεσμα*
Δοκιμή οξείδωσης/ζύμωσης (O/F)	Αδρανές ή ασθενώς οξειδωτικό
Ενεργότητα οξειδάσης	–
Ανάπτυξη στους 37 °C	–
Ενεργότητα ουρεάσης	–
Υδρόλυση αισκουλίνης	+
Υδρόλυση αμύλου	– ή ασθενής
Ανοχή σε 7 % NaCl	–
Παραγωγή ινδόλης	–
Δραστηριότητα καταλάσης	+
Παραγωγή H_2S	–
Χρησιμοποίηση κιτρικών ιόντων	–
Υγροποίηση ζελατίνης	–
Παραγωγή οξέος από γλυκερίνη	–
Παραγωγή οξέος από λακτόζη	– ή ασθενής
Παραγωγή οξέος από ραμνόζη	–
Παραγωγή οξέος από σαλικίνη	–
Χρώση κατά Gram (προσάρτημα 9)	+

9.2. **Δοκιμή IF**

(α) Παρασκευάζεται αιώρημα περίπου 10^6 κυττάρων ανά ml σε ρυθμιστικό διάλυμα IF (προσάρτημα 3).

(β) Παρασκευάζεται σειρά διπλών αραιώσεων κατάλληλου αντιορρού.

(γ) Εφαρμόζουμε τη διαδικασία IF (ενότητα 4).

(δ) Επιτυγχάνεται θετική δοκιμή IF εάν ο τίτλος IF της καλλιέργειας είναι ισοδύναμος με αυτόν του θετικού μάρτυρα.

9.3. **Δοκιμή PCR**

(α) Παρασκευάζεται αιώρημα περίπου 10^6 κυττάρων ανά ml σε υπέρ καθαρό νερό (UPW).

(β) Θερμαίνονται 100 μl του αιωρήματος κυττάρων σε κλειστούς σωλήνες σε θερμικό μπλοκ ή αναβράζον υδατόλουτρο στους 100 °C για 4 λεπτά. Εάν είναι απαραίτητο, η προσθήκη NaOH που έχει μόλις παρασκευασθεί σε τελική συγκέντρωση 0,05 M είναι δυνατόν να συμβάλει στη λύση των

κυττάρων. Τα δείγματα μπορούν τότε να αποθηκευθούν σε θερμοκρασία – 16 έως – 24 °C έως ότου χρειασθεί να χρησιμοποιηθούν.

(γ) Εφαρμόζονται οι κατάλληλες διαδικασίες PCR για να ενισχυθούν τα *ειδικά αμπλικόνια* του *C. m.* subsp. *sepedonicus* (π.χ. Pastrik, 2000· βλέπε προσάρτημα 4· Li και de Boer, 1995· Mills *et al.*, 1997· Pastrik και Rainey, 1999· Mills *et al.*, 1999)·

(δ) Επιτυγχάνεται θετική ταυτοποίηση του *C. m.* subsp. *sepedonicus* εάν τα αμπλικόνια της PCR έχουν το ίδιο μέγεθος και τους ίδιους πολυμορφισμούς μήκους θραυσμάτων εκ περιορισμού όπως το στέλεχος των θετικών μαρτύρων.

9.4. **Δοκιμή FISH**

(α) Παρασκευάζεται αιώρημα περίπου 10^6 κυττάρων ανά ml σε UPW.

(β) Εφαρμόζουμε τη διαδικασία FISH (ενότητα 5).

(γ) Επιτυγχάνεται θετική δοκιμή FISH εάν επιτυγχάνονται οι ίδιες αντιδράσεις από την καλλιέργεια και το θετικό μάρτυρα.

9.5. **Προφίλ σε λιπαρά οξέα (FAP)**

(α) Η καλλιέργεια αναπτύσσεται σε trypticase soy agar (Oxoid) για 72 ώρες στους 21 °C (+/– 1°).

(β) Εφαρμόζεται κατάλληλη διαδικασία FAP (Janse, 1991· Stead, 1992).

(γ) Επιτυγχάνεται θετική δοκιμή FAP εάν το προφίλ της πιθανής καλλιέργειας είναι το ίδιο με αυτό του θετικού μάρτυρα. Η παρουσία χαρακτηριστικών λιπαρών οξέων είναι 15:1 Anteiso A, 15:0 Iso, 15:0 Anteiso, 16:0 Iso, 16:0 και 17:0. Το Anteiso είναι σε μεγάλο βαθμό ενδεικτικό του *C. m.* ssp *sepedonicus*. Άλλα γένη όπως το *Curtobacterium*, το *Arthrobacter* και το Micrococcus έχουν επίσης ορισμένα από τα οξέα αυτά αλλά το 15:1 Anteiso A είναι σπάνιο οξύ στα εν λόγω βακτήρια ενώ παρουσιάζεται σε όλα τα *Clavibacter* spp. και σε ποσοστό 1-5 %: Στο *C. m.* ssp *sepedonicus* η τιμή είναι συνήθως γύρω στο 5 %.

9.6. **BOX-PCR**

(α) Παρασκευάζεται αιώρημα περίπου 10^6 κυττάρων ανά ml σε UPW.

(β) Η δοκιμή εφαρμόζεται σύμφωνα με τη διαδικασία (Smith *et al.*, 2001).

10. ΔΟΚΙΜΗ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗΣ

Η δοκιμή παθογένειας πρέπει να πραγματοποιείται ως τελική επιβεβαίωση της διάγνωσης του *C. m.* subsp. *sepedonicus* καθώς και για την εκτίμηση της παθογένειας των καλλιεργειών που ταυτοποιούνται ως *C. m.* subsp. *sepedonicus*:

10.1. Παρασκευάζεται ένα μόλυσμα περίπου 10^6 κυττάρων ανά ml από καλλιέργειες 3 ημερών της απομόνωσης προς δοκιμή καθώς και κατάλληλο στέλεχος θετικού μάρτυρα του *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

10.2. Μολύνονται 5-10 στελέχη νεαρών σποροφύτων μελιτζάνας στο στάδιο του 3 πραγματικού φύλλου (ενότητα 7.3 ή 7.4).

10.3. Επωάζονται σε 18-24 °C με επαρκές φως και υψηλή σχετική υγρασία με κατάλληλο πότισμα έτσι ώστε να αποφευχθεί η υπεράρδευση ή η καταπόνηση από ξηρασία (ενότητα 7.7). Στις καθαρές καλλιέργειες, ο τυπικός μαρασμός επέρχεται εντός 2 εβδομάδων αλλά τα φυτά που δεν εμφανίζουν συμπτώματα (βλέπε ενότητα 7.8) μετά την παρέλευση του χρονικού διαστήματος αυτού πρέπει να επωάζονται έως 3 εβδομάδες σε θερμοκρασίες που ευνοούν την ανάπτυξη των φυτών μελιτζάνας αλλά δεν υπερβαίνουν τους 25 °C (προσάρτημα 8). Εάν δεν εμφανιστούν συμπτώματα εντός 3 εβδομάδων, η καλλιέργεια δεν μπορεί να επαληθευθεί ως παθογόνος μορφή του *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

10.4. Πραγματοποιείται απομόνωση από φυτά που παρουσιάζουν συμπτώματα με αφαίρεση τμήματος του στελέχους 2 cm πάνω από το σημείο μόλυνσης. Τεμαχίζουμε τους ιστούς και παρασκευάζουμε αιώρημα σε ένα μικρό όγκο αποστειρωμένου, αποσταγμένου νερού ή σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (προσάρτημα 3). Απομονώνουμε από το αιώρημα με εξάπλωση αραιώσεων ή γραμμική εξάπλωση σε MTNA και YPGA (προσάρτημα 5), επωάζουμε για 3-5 ημέρες στους 21-23 °C και παρατηρούμε το σχηματισμό τυπικών αποικιών του *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

Προσάρτημα 1

Εμπλεκόμενα εργαστήρια στη βελτιστοποίηση και επικύρωση των πρωτοκόλλων

Εργαστήριο [1]	Θέση	Χώρα
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Βιέννη και Linz	Αυστρία
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Βέλγιο
Plantedirektoratet	Lyngby	Δανία
Central Science Laboratory	York	Αγγλία
Scottish Agricultural Science Agency	Εδιμβούργο	Σκωτία
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	Γαλλία
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Γαλλία
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Γερμανία
Pflanzenschutzamt Hannover	Ανόβερο	Γερμανία
State Laboratory	Δουβλίνο	Ιρλανδία
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Κάτω Χώρες
Norwegian Crop Research Institute, Plant Protection Centre	Aas	Νορβηγία
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Λισσαβόνα	Πορτογαλία
Nacionalni institut za biologijo	Λουμπλιάνα	Σλοβενία
Centro de Diagnóstico de Aldearrubia	Salamanca	Ισπανία

(1) Στοιχεία επιστημόνων: βλέπε ιστοχώρο http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

Προσάρτημα 2

Παρασκευή θετικών και αρνητικών μαρτύρων για τις βασικές δοκιμές διαλογής PCR/IF και FISH

Παράγεται καλλιέργεια 72 ωρών παθογόνου στελέχους του *C. m.* subsp. *sepedonicus* [NCPPB 4053 ή PD 406] σε βασικό υπόστρωμα MTNA και παρασκευάζεται αιώρημα σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM έτσι ώστε να επιτευχθεί πυκνότητα κυττάρων περίπου 1 έως 2 × 10^8 cfu ανά ml. Αυτό επιτυγχάνεται συνήθως με ελαφρώς θολό αιώρημα ισοδύναμο με οπτική πυκνότητα 0,20 σε 600 nm.

Αφαιρούνται κώνοι από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου 200 κονδύλων που έχουν ληφθεί από την παραγωγή ποικιλίας λευκής επιδερμίδας, η οποία είναι γνωστό ότι είναι απαλλαγμένη από το *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

Οι κώνοι από τα σημεία πρόσφυσης του στολονίου υποβάλλονται σε κατεργασία όπως συνήθως και το ίζημα αναδιαλύεται σε 10 ml.

Παρασκευάζονται 10 αποστειρωμένα μικροφιαλίδια των 1,5 ml με 900 μl αναδιαλυμένου ιζήματος.

Μεταφέρονται 100 μl αιωρήματος *C. m.* subsp. *sepedonicus* στο πρώτο μικροφιαλίδιο. Αναδεύουμε με στροβιλισμό (vortex).

Προσδιορίζονται τα δεκαδικά επίπεδα μόλυνσης με περαιτέρω αραίωση στα επόμενα πέντε μικροφιαλίδια.

Τα έξι μολυσμένα μικροφιαλίδια θα χρησιμοποιηθούν ως θετικοί μάρτυρες. Τα τέσσερα μη μολυσμένα μικροφιαλίδια θα χρησιμοποιηθούν ως αρνητικοί μάρτυρες. Τα μικροφιαλίδια μαρκάρονται καταλλήλως.

Παρασκευάζονται ποσότητες 100 μl σε αποστειρωμένα μικροφιαλίδια των 1,5 ml και, κατ' αυτόν τον τρόπο, παράγονται 9 επαναλήψεις κάθε δείγματος μάρτυρα. Αποθηκεύονται στους – 16 έως – 24 °C έως ότου χρησιμοποιηθούν.

Η παρουσία και ο ποσοτικός προσδιορισμός του *C. m.* subsp. *sepedonicus* στα δείγματα μαρτύρων πρέπει να επιβεβαιωθούν πρώτα από τη δοκιμή IF.

Για τη δοκιμή PCR πραγματοποιείται εξαγωγή DNA από δείγματα θετικών και αρνητικών μαρτύρων με κάθε σειρά δειγμάτων δοκιμής.

Για τις δοκιμές IF και FISH πραγματοποιούνται δοκιμές σε δείγματα θετικών και αρνητικών μαρτύρων με κάθε σειρά δειγμάτων δοκιμής.

Για τις δοκιμές IF, FISH και PCR, το *C. m.* subsp. *sepedonicus* πρέπει να ανιχνευθεί σε τουλάχιστον 10^6 και 10^4 κύτταρα/ml των θετικών μαρτύρων και σε κανέναν από τους αρνητικούς μάρτυρες.

Προσάρτημα 3

Ρυθμιστικά διαλύματα για τις διαδικασίες δοκιμής

ΓΕΝΙΚΑ: Τα αποστειρωμένα ρυθμιστικά διαλύματα που δεν έχουν ανοιχθεί μπορούν να αποθηκευθούν έως ένα έτος.

1. **Ρυθμιστικά διαλύματα για τη διαδικασία εξαγωγής**

1.1. *Ρυθμιστικό διάλυμα εξαγωγής (50 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 7,0)*

Το εν λόγω ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται για την εξαγωγή του βακτηρίου από ιστούς φυτών με ομοιογενοποίηση ή ανάδευση.

Na_2HPO_4 (άνυδρο) 4,26 g
KH_2PO_4 2,72 g
Αποσταγμένο νερό 1,00 l

Διαλύονται τα συστατικά, ελέγχεται η τιμή του pH και το υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 °C επί 15 λεπτά.

Πρόσθετα συστατικά μπορούν να είναι χρήσιμα ως ακολούθως:

	Σκοπός	Ποσότητα (ανά l)
Lubrol flakes	Αντικροκιδωτικό (*)	0,5 g
DC silicone antifoam	Αντιαφριστικός παράγοντας (*)	1,0 ml
Tetrasodium pyrophosphate	Αντιοξειδωτικό	1,0 g
Polyvinylpyrrolidone-40 000 (PVP-40)	Δέσμευση παρεμποδιστών της PCR	50 g

(*) Για χρήση στο πλαίσιο της μεθόδου εξαγωγής με ομοιογενοποίηση.

1.2. *Ρυθμιστικό διάλυμα ιζήματος (10 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 7,2)*

Το εν λόγω ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται για επανασχηματισμό αιωρήματος και αραίωση εκχυλισμάτων κώνων από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου κονδύλων πατάτας μετά τη συγκέντρωση σε ίζημα μέσω φυγοκέντρισης.

$Na_2HPO_4.12H_2O$ 2,7 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$ 0,4 g
Αποσταγμένο νερό 1,00 l

Διαλύονται τα συστατικά, ελέγχεται η τιμή του pH και το υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 °C επί 15 λεπτά.

2. **Ρυθμιστικά διαλύματα για τη δοκιμή IF**

2.1. *Ρυθμιστικό διάλυμα IF (10 mM φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα άλατος (PBS), pH 7,2)*

Το ρυθμιστικό διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται για την αραίωση των αντισωμάτων.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,4 g
NaCl	8,0 g
Αποσταγμένο νερό	1,0 l

Διαλύονται τα συστατικά, ελέγχεται η τιμή του pH και το υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 °C επί 15 λεπτά.

2.2. *Ρυθμιστικό διάλυμα IF-Tween*

Αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται για την πλύση των αντικειμενοφόρων πλακών.

Προστίθεται 0,1 % Tween 20 στο ρυθμιστικό διάλυμα IF.

2.3. *Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα γλυκερίνης, pH 7,6*

Αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται ως ρευστό έγκλεισης στα φατνία των αντικειμενοφόρων πλακών της IF για την ενίσχυση του φθορισμού.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	3,2 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,15 g
Γλυκερίνη	50 ml
Αποσταγμένο νερό	100 ml

Αντιξεθωριαστικά διαλύματα υλικού έγκλεισης διατίθενται στο εμπόριο π.χ. Vectashield® (Vector Laboratories) ή Citifluor® (Leica).

Προσάρτημα 4

Προσδιορισμός του επιπέδου μόλυνσης στις δοκιμές IF και FISH

1. Μετράται ο μέσος αριθμός των τυπικών φθοριζόντων κυττάρων ανά οπτικό πεδίο (c).

2. Υπολογίζεται ο αριθμός των τυπικών φθοριζόντων κυττάρων ανά φατνίο αντικειμενοφόρου πλάκας μικροσκοπίου (C).

$C = c \times S/s$

όπου S = εμβαδόν του φατνίου μιας πολυφατνιακής αντικειμενοφόρου και
s = εμβαδόν του οπτικού πεδίου του αντικειμενικού

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

όπου i = συντελεστής πεδίου (κυμαίνεται από 8 έως 24 ανάλογα με τον τύπο του προσοφθαλμίου)
K = συντελεστής σωλήνα (1 ή 1,25)
G = μεγεθυντική ισχύς του αντικειμενικού φακού (100x, 40x κ.λπ.).

3. Υπολογίζεται ο αριθμός τυπικών φθοριζόντων κυττάρων ανά ml αναδιαλυμένου ιζήματος (N)

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

όπου y = όγκος του αναδιαλυμένου ιζήματος σε κάθε φατνίο και
F = συντελεστής αραίωσης του αναδιαλυμένου ιζήματος.

Προσάρτημα 5

Θρεπτικά υποστρώματα για την απομόνωση και καλλιέργεια του *C. m.* subsp. *sepedonicus*

(α) Γενικά θρεπτικά υποστρώματα καλλιέργειας

Nutrient agar (NA)

Nutrient agar (Difco)	23,0 g
Αποσταγμένο νερό	1,0 l

Διαλύονται τα συστατικά και το υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121°C επί 15 λεπτά.

Nutrient dextrose agar (NDA)

Difco bacto nutrient agar που περιέχει 1 % D(+) γλυκόζη (μονοϋδρική).

Αποστείρωση σε αυτόκαυστο στους 115 °C επί 20 λεπτά.

Yeast peptone glucose agar (YPGA)

Yeast Extract (Difco)	5,0 g
Bacto-Peptone (Difco)	5,0 g
D(+)-γλυκόζη (μονοϋδρική)	10,0 g
Bacto-Agar (Difco)	15,0 g
Αποσταγμένο νερό	1,0 l

Διαλύονται τα συστατικά και το υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 °C επί 15 λεπτά.

Υπόστρωμα yeast extract mineral salts (YGM)

Bacto-Yeast-Extract (Difco)	2,0 g
D(+)-γλυκόζη (μονοϋδρική)	2,5 g
K_2HPO_4	0,25 g
KH_2PO_4	0,25 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,1 g
$MnSO_4.H_2O$	0,015 g
NaCl	0,05 g
$FeSO_4.7H_2O$	0,005 g
Bacto-Agar (Difco)	18 g

Αποσταγμένο νερό	1,0 l

Διαλύονται τα συστατικά και το υπόστρωμα αποστειρώνεται σε παρτίδες του 1/2 λίτρου, σε αυτόκαυστο, στους 115 °C επί 20 λεπτά.

(β) *Επικυρωμένα εκλεκτικά υποστρώματα ανάπτυξης*

Υπόστρωμα MTNA

Εκτός και αν υπάρχει διαφορετική αναφορά, όλα τα συστατικά υποστρώματος προέρχονται από την BDH

Yeast Extract (Difco)	2,0 g
Μαννιτόλη	2,5 g
K_2HPO_4	0,25 g
KH_2PO_4	0,25 g
NaCl	0,05 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,1 g
$MnSO_4.H_2O$	0,015 g
$FeSO_4.7H_2O$	0,005 g
Agar (Oxoid αριθ. 1)	16,0 g
Αποσταγμένο νερό	1,0 l

Διαλύονται τα συστατικά, το pH ρυθμίζεται στο 7,2. Μετά την αποστείρωση σε αυτόκαυστο (στους 121 °C για 15 λεπτά) και την ψύξη στους 50 °C, προστίθενται τα αντιβιωτικά: trimethoprim 0,06 g, nalidixic acid 0,002 g, amphotericin B 0,01 g.

Πυκνά διαλύματα αντιβιοτικών: trimethoprim (Sigma) και nalidixic acid (Sigma) (και τα δύο σε 5 mg/ml), σε 96 % μεθανόλη, amphotericin B (Sigma) (1 mg/ml) σε dimethyl sulfoxide. Τα πυκνά διαλύματα αποστειρώνονται με διήθηση μέσω φίλτρου.

Σημείωση:

Η διατηρησιμότητα τουβασικού θρεπτικού υλικού είναι 3 μήνες. Μετά την προσθήκη των αντιβιοτικών, η διατηρησιμότητα είναι 1 μήνας εάν το υλικό αποθηκεύεται στο ψυγείο.

Υπόστρωμα NCP-88

Nutrient agar (Difco)	23 g
Yeast Extract (Difco)	2 g
D-μαννιτόλη	5 g
K_2HPO_4	2 g
KH_2PO_4	0,5 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,25 g

Αποσταγμένο νερό 1,0 l

Διαλύονται τα συστατικά, το pH ρυθμίζεται στο 7,2. Μετά την αποστείρωση σε αυτόκαυστο και την ψύξη στους 50 °C, προστίθενται τα ακόλουθα αντιβιοτικά: Polymyxin B sulphate (Sigma) 0,003g, nalidixic acid (Sigma) 0,008 g, Cycloheximide (Sigma) 0,2 g.

Τα αντιβιοτικά διαλύονται σε πυκνά διαλύματα ως εξής: το nalidixic acid σε 0,01 M NaOH, το cycloheximide σε 50 % αιθανόλης, το polymyxin B sulphate σε αποσταγμένο νερό. Τα πυκνά διαλύματα αποστειρώνονται με διήθηση μέσω φίλτρου.

Σημείωση:

Η διατηρησιμότητα του βασικού θρεπτικού υλικού είναι 3 μήνες. Μετά την προσθήκη των αντιβιοτικών, το υλικό είναι διατηρήσιμο για 1 μήνα εάν αποθηκεύεται στο ψυγείο.

Προσάρτημα 6

Επικυρωμένα πρωτόκολλα και αντιδραστήρια PCR

Σημείωση:

Οι προκαταρκτικές δοκιμές πρέπει να επιτρέπουν την αναπαραγώγιμη ανίχνευση τουλάχιστον 10^3 έως 10^4 κυττάρων του C. m. ssp. sepedonicus ανά ml εκχυλίσματος δείγματος.

Οι προκαταρκτικές δοκιμές πρέπει επίσης να μην δείχνουν οιαδήποτε λανθασμένα θετικά αποτελέσματα με ένα σύνολο επιλεγμένων στελεχών βακτηρίων.

1. Πρωτόκολλο πολλαπλής PCR με εσωτερικό μάρτυρα PCR (Pastrik, 2000)

1.1. *Εκκινητές ολιγονουκλεοτιδίων*

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

Αναμενόμενο μέγεθος του αμπλικονίου από το DNA αναφοράς του *C. m.* subsp. *sepedonicus* = 502 bp (σετ εκκινητών PSA).

Αναμενόμενο μέγεθος αμπλικονίου από εσωτερικό μάρτυρα της PCR 18S rRNA = 377 bp (σετ εκκινητών NS).

1.2. *Μείγμα αντίδρασης PCR*

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση	Τελική συγκέντρωση
Αποστειρωμένο UPW	15,725 µl	
10x ρυθμιστικό διάλυμα PCR [1] (15 mM MgCl2)	2,5 µl	1x (1,5 mM MgCl2)
BSA (κλάσμα V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
Μείγμα d-nTP (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Εκκινητής PSA-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Εκκινητής PSA-R (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Εκκινητής NS-7-F (10 µM) [2]	0,1 µl	0,04 µM
Εκκινητής NS-8-R (10 µM) [2]	0,1 µl	0,04 µM1,0 U
Taq πολυμεράση (5 U/µl) [1]	0,2 µl	
Όγκος δείγματος	5,0 µl	
Συνολικός όγκος	25,0 µl	

(1) Οι μέθοδοι επικυρώθηκαν χρησιμοποιώντας την Taq πολυμεράση των Perkin Elmer (AmpliTaq ή Gold) και Gibco BRL.
(2) Η συγκέντρωση των εκκινητών NS-7 F και NS-8-R βελτιστοποιήθηκε για το εκχύλισμα κώνου από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου πατάτας χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ομοιογενοποίησης και τον καθαρισμό DNA σύμφωνα με τον Pastrik (2000) [βλέπε ενότητα 6.1.α) και 6.2]. Η επαναβελτιστοποίηση των συγκεντρώσεων αντιδραστηρίων θα απαιτηθεί εάν χρησιμοποιηθεί η εξαγωγή με ανάδευση ή άλλη μέθοδο απομόνωσης του DNA.

1.3. *Συνθήκες αντίδρασης PCR*

Ακολουθείται το εξής πρόγραμμα:

1 κύκλος από:	i) 3 λεπτά στους 95 °C (μετουσίωση του πρότυπου DNA)
10 κύκλοι από:	ii) 1 λεπτό στους 95 °C (μετουσίωση του πρότυπου DNA) iii) 1 λεπτό στους 64 °C (προσκόλληση εκκινητών) iv) 1 λεπτό στους 72 °C (επέκταση αντιγράφου)
25 κύκλοι σε:	v) 30 δευτερόλεπτα στους 95 °C (μετουσίωση του αρχικού DNA) vi) 30 δευτερόλεπτα στους 62 °C (προσκόλληση εκκινητών) vii) 1 λεπτό στους 72 °C (επέκταση αντιγράφου)
1 κύκλος από:	viii) 5 λεπτά στους 72 °C (τελική επέκταση) ix) διατήρηση στους 4 °C.

Σημείωση:

Το πρόγραμμα αυτό βελτιστοποιείται για χρήση με θερμικό κυκλοποιητή MJ Research PTC 200. Ενδέχεται να απαιτηθεί τροποποίηση της διάρκειας των βημάτων των κύκλων ii), iii) iv), v), vi) και vii) για χρήση με άλλα μοντέλα.

1.4. *Ανάλυση του αμπλικονίου με ένζυμο περιορισμού*

Τα προϊόντα PCR που έχουν ενισχυθεί από το DNA του *C. m.* subsp. *sepedonicus* παράγουν έναν χαρακτηριστικό πολυμορφισμό μήκους θραυσμάτων εκ περιορισμού με το ένζυμο Bgl II μετά από επώαση στους 37 °C για 30 λεπτά. Τα θραύσματα εκ περιορισμού που αποκτώνται από το ειδικό για το *C. m.* subsp. *sepedonicus* θραύσμα έχουν μέγεθος 282 bp και 220 bp.

2. Παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης

2.1. *Bromophenol blue (10 %-μητρικό διάλυμα)*

Bromophenol blue	5 g
Αποσταγμένο νερό (διπλά αποσταγμένο)	50 ml

2.2. *Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης*

Γλυκερίνη (86 %)	3,5 ml
Bromophenol blue (5.1)	300 μl
Αποσταγμένο νερό (διπλά αποσταγμένο)	6,2 ml

3. 10x Tris Acetate EDTA (TAE) ρυθμιστικό διάλυμα, pH 8,0

Ρυθμιστικό διάλυμα Tris	48,4 g
Κρυσταλλικό οξικό οξύ	11,42 ml
EDTA (disodium salt)	3,72 g
Αποσταγμένο νερό	1,00 l

Διαλύεται σε 1x πριν από τη χρήση.

Διατίθεται επίσης στο εμπόριο (π.χ. Invitrogen ή ισοδύναμο).

Προσάρτημα 7

Επικυρωμένα αντιδραστήρια για τη δοκιμή FISH

1. **Ολιγοανιχνευτές**

Εξειδικευμένος ανιχνευτής για το *Cms* CMS-CY3-01:
5'- ttg cgg ggc gca cat ctc tgc acg -3'

Μη εξειδικευμένος ανιχνευτής ευβακτηρίου EUB-338-FITC:
5'- gct gcc tcc cgt agg agt-3'

2. **Προσηλωτικό διάλυμα**

[ΠΡΟΣΟΧΗ! ΤΟ ΠΡΟΣΗΛΩΤΙΚΟ ΥΓΡΟ ΠΕΡΙΕΧΕΙ ΠΑΡΑΦΟΡΜΑΛΔΕΫΔΗ Η ΟΠΟΙΑ ΕΙΝΑΙ ΤΟΞΙΚΗ. ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΦΟΡΟΥΝΤΑΙ ΓΑΝΤΙΑ ΚΑΙ ΝΑ ΜΗΝ ΓΙΝΟΝΤΑΙ ΕΙΣΠΝΟΕΣ. ΣΥΝΙΣΤΑΤΑΙ Η ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΕ ΑΠΑΓΩΓΟ]

(i) Θερμαίνονται 9 ml ύδατος μοριακού βαθμού καθαρότητας [π.χ. υπέρ καθαρό νερό (UPW)] σε περίπου 60 °C και προστίθενται 0,4 g παραφορμαλδεϋδης. Η παραφορμαλδεϋδη διαλύεται μετά την προσθήκη 5 σταγόνων 1N NaOH και αναδεύεται με μαγνητικό αναδευτήρα.

(ii) Το pH ρυθμίζεται στην τιμή 7.0 με την προσθήκη 1ml 0,1 M φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (PB· pH 7.0) και 5 σταγόνων 1N HCl. Ελέγχεται το pH με ταινίες δεικτών και προσαρμόζεται εάν είναι απαραίτητο με HCl ή NaOH.

[ΠΡΟΣΟΧΗ! ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΕΙΤΑΙ ΠΕΧΑΜΕΤΡΟ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΜΕ ΠΑΡΑΦΟΡΜΑΛΔΕΫΔΗ]

(iii) Το διάλυμα φιλτράρεται μέσω φίλτρου μεμβράνης 0,22 μm και διατηρείται απαλλαγμένο από σκόνη στους 4 °C έως ότου ξαναχρησιμοποιηθεί.

(iv) *Σημείωση:*

Εναλλακτικό προσηλωτικό διάλυμα: 96 % αιθανόλη.

3. **3x Hybmix**

NaCl	2,7 M
Tris-HCl	60 mM (pH 7,4)
EDTA (αποστειρωμένο με διήθηση από φίλτρο και σε αυτόκαυστο)	15 mM

Αραιώνεται 1x, όπως απαιτείται.

4. **Διάλυμα υβριδισμού**

1x Hybmix

Sodium dodecyl sulphate (SDS)	0,01 %
ανιχνευτής EUB 338	5 ng/μl
ανιχνευτής '43MSCY301	5 ng/μl

Παρασκευάζονται ποσότητες διαλύματος υβριδισμού σύμφωνα με τους υπολογισμούς του πίνακα. Για κάθε αντικειμενοφόρο (που περιλαμβάνει 2 διαφορετικά δείγματα εις διπλούν) απαιτούνται 90 μl διαλύματος υβριδισμού.

Πίνακας: Συνιστώμενες ποσότητες για την παρασκευή του μείγματος υβριδισμού.

	2 αντικειμενοφόρες πλάκες	8 αντικειμενοφόρες πλάκες
Αποστειρωμένο UPW	50,1	200,4
3x hybmix	30,0	120,0
1 % SDS	0,9	3,6
Ανιχνευτής EUB 338(100 ng/μl)	4,5	18,0
Ανιχνεϋτής CMSCY301 (100 ng/μl)	4,5	18,0
Συνολικός όγκος (μl)	90,0	360,0

Σημείωση: Όλα τα διαλύματα που περιλαμβάνουν ολιγοανιχνευτές ευαίσθητους στο φως αποθηκεύονται στο σκοτάδι στους – 20 °C. Προστατεύονται από το άμεσο φως του ηλίου ή το ηλεκτρικό φως κατά τη χρήση.

5. **0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 7,0**

Na_2HPO_4	8,52 g
KH_2PO_4	5,44 g
Αποσταγμένο νερό	1,00 l

Διαλύονται τα συστατικά, ελέγχεται η τιμή του pH και το υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 °C επί 15 λεπτά.

Προσάρτημα 8

Καλλιέργεια φυτών μελιτζάνας

Σπόροι μελιτζάνας (*Solanum melongena*) σπέρνονται σε παστεριωμένο υπόστρωμα. Μετά την πλήρη έκπτυξη των κοτυληδόνων (10-14 ημέρες), τα σποróφυτα μεταφυτεύονται σε γλάστρες με παστεριωμένο υπόστρωμα.

Τα φυτά μελιτζάνας πρέπει να καλλιεργούνται σε θερμοκήπιο με τις ακόλουθες συνθήκες περιβάλλοντος:

Μήκος ημέρας		14 ώρες ή φυσικό μήκος ημέρας, αν είναι μεγαλύτερο.
Θερμοκρασία	ημέρα	21 έως 24 °C,
	νύχτα	15 °C.

Ευπαθείς ποικιλίες φυτών μελιτζάνας: «Black Beauty»,
«Long Tom»,
«Rima»,
«Balsas».

Προμηθευτής: βλέπε ιστοχώρο http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

---

Προσάρτημα 9

Διαδικασία χρώσης κατά Gram (τροποποίηση του Hucker) (Doetsch, 1981) [1]

Διάλυμα crystal violet

Διαλύονται 2 g crystal violet σεε 20 ml αιθανόλη 95 %.

Διαλύονται 0,8 g οξαλικού αμμωνίου σε 80 ml αποσταγμένου νερού.

Αναμειγνύονται τα δύο διαλύματα.

Ιώδιο του Lugol

Ιώδιο	1 g
Ιωδιούχο κάλιο	2 g
Αποσταγμένο νερό	300 ml

Τα στερεά κονιοποιούνται σε ιγδίο. Προστίθενται στο νερό και αναδεύονται εντός κλειστού δοχείου μέχρις ότου διαλυθούν.

Διάλυμα επίχρωσης σαφρανίνης

Αποθεματικό διάλυμα:

Σαφρανίνη Ο	2,5 g
95 % αιθανόλη	100 ml

Αναμειγνύονται και αποθηκεύονται.

Αραιώνεται: 1:10 για την απόκτηση του διαλύματος εργασίας.

Διαδικασία χρώσης

1. Το δείγμα εξαπλούται ως λεπτό φιλμ στην αντικειμενοφόρο, ξηραίνεται στον αέρα και προσηλώνεται με θερμότητα.

2. Η αντικειμενοφόρος καλύπτεται πλήρως, επί 1 λεπτό, με διάλυμα crystal violet.

3. Η αντικειμενοφόρος πλένεται σύντομα με νερό της βρύσης.

4. Η αντικειμενοφόρος καλύπτεται πλήρως με ιώδιο του Lugol επί 1 λεπτό.

5. Η αντικειμενοφόρος πλένεται με νερό της βρύσης και στεγνώνεται με διηθητικό χαρτί.

6. Η αντικειμενοφόρος πλάκα αποχρωματίζεται με 95 % αιθανόλη που προστίθεται στάγδην μέχρι να παύσει η αφαίρεση χρώματος ή η

αντικειμενοφόρος εμβαπτίζεται, με ελαφρή ανάδευση, σε αιθανόλη 95 % επί 30 δευτερόλεπτα.

7. Η αντικειμενοφόρος πλένεται με νερό της βρύσης και στεγνώνεται με διηθητικό χαρτί.

8. Η αντικειμενοφόρος καλύπτεται πλήρως με διάλυμα σαφρανίνης επί 10 δευτερόλεπτα.

9. Η αντικειμενοφόρος πλένεται με νερό της βρύσης και στεγνώνεται με διηθητικό χαρτί.

Τα θετικά κατά Gram βακτήρια εμφανίζουν ιώδη-κυανό χρωματισμό. Τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια εμφανίζουν ρόδινοερυθρό χρωματισμό.

---

(1) Είναι επίσης δυνατόν να χρησιμοποιηθούν διαλύματα καθώς και μέσα χρώσης (staining kids) που διατίθενται στο εμπόριο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Anonymous, 1987. Scheme of the detection and diagnosis of the ring rot bacterium *Corynebacterium sepedonicum* in batches of potato tubers. Επιτροπή των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, Λουξεμβούργο. Publ EUR 11 288 EN, 21 σ.

2. Bradbury, J. F., 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. Rev. Pl. Path., 49, 213-218.

3. Dinesen, I. G., 1984. The extraction and diagnosis of *Corynebacterium sepedonicum* from diseased potato tubers. EPPO Bull. 14 (2), 147-152.

4. Doetsch, R. N., 1981. Determinative methods of light microscopy. In: Manual of methods for general bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, 21-23.

5. Hugh, R. and Leifson, F., 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. J. Bact., 66, 24-26.

6. Janse, J. D., 1991. Infra- and intraspecific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty acid analysis. Systematic and Applied Microbiology 14; 335-345.

7. Janse, J. D. and J. Van Vaerenbergh, 1987. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (*Corynebacterium sepedonicum*) in potato. EPPO Bull., 17, 1-10.

8. Jansing, H. and K. Rudolph, 1998. Physiological capabilities of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* and development of a semi-selective medium. Journal of Plant Diseases and Protection, 105, 590-601.

9. Kovacs, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature, Lond., 178, 703.

10. Klement Z.; K. Rudolph, and D. C. Sands, 1990. Methods in Phytobacteriology. Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 σ.

11. Lelliott, R. A., 1966. The plant pathogenic coryneform bacteria. J. appl. Bact., 29, 114-118.

12. Lelliott, R. A., E. Billing and A.C. Hayward, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads J. appl. Bact., 29, 470-489.

13. Lelliott, R. A., and P. W. Sellar, 1976. The detection of latent ring rot (*Corynebacterium sepedonicum* (Spiek. et Kotth.) Skapt. et Burkh.) in potato stocks. EPPO Bull., 6 (2), 101-106.

14. Li, X. and S.H. de Boer, 1995. Selection of Polymerase Chain Reaction primers from RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Phytopathology, 85, 837-842.

15. Mills, D., Russell, B., W. and J., W. Hanus, 1997. Specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* by amplification of three unique DNA sequences isolated by subtraction hybridization. Phytopathology, 87, (8), 853-861.

16. Pastrik, K. -H. and R.A. Rainey, 1999. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. J. Phytopathology 147, 687-693.

17. Pastrik, K.-H., 2000. Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. European Journal of Plant Pathology, 106, 155-165.

18. Ramamurthi, C. S., 1959. Comparative studies on some Gram-positive phytopathogenic bacteria and their relationship to the Corynebacteria. Mem. Cornell agric. Exp. Sta., 366, 52 σ.

19. Schaad, W., Y. Berthier-Schaad, A. Sechler, and D. Knorr, 1999. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system. Plant Disease 83, 1095-1100.

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

21. Skerman, V. B. D., 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria. 2nd ed., William and Wilkins Company, Baltimore.

22. Smith, N. C.; J. Hennessy, and D.E., Stead, 2001. Repetetive sequence-derived PCR profiling using the BOX-A1*Ralstonia solanacearum* primer for rapid identification of plant pathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. European Journal of Plant Pathology, 107 (7), 739-748.

23. Sneath, P. H. A. and V. G. Collins, 1974. A study in test reproductibility between laboratories: report of Pseudomonas working party. Antonie van Leeuwenhoek, 40, 481-527.

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

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

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

1. Για κάθε πιθανολογούμενη παρουσία για την οποία υπάρχει θετικό αποτέλεσμα στη δοκιμή(-ές) διαλογής σύμφωνα με τις μεθόδους που ορίζονται στο Παράρτημα Ι και για την οποία αναμένεται επιβεβαίωση ή διάψευση με την ολοκλήρωση των εν λόγω μεθόδων, παρακρατούνται και φυλάσσονται κατάλληλα:

   (α) Όλοι οι κόνδυλοι του δείγματος και, όταν είναι εφικτό, όλα τα φυτά της δειγματοληψίας,

   (β) κάθε εναπομένον εκχύλισμα και πρόσθετο υλικό που παρασκευάσθηκε για την ή τις δοκιμές διαλογής π.χ. αντικειμενοφόροι πλάκες ανοσοφθορισμού,

   και

   (γ) όλη η σχετική τεκμηρίωση,

   μέχρι την ολοκλήρωση των εν λόγω μεθόδων.

   Με την παρακράτηση των κονδύλων θα καταστήσει δυνατή η δοκιμή ποικιλιών, όπου αυτό ενδείκνυται.

2. Σε περίπτωση θετικής επιβεβαίωσης του οργανισμού, παρακρατείται και φυλάσσεται καταλλήλως:

   (α) Το υλικό που αναφέρεται στην παράγραφο 1·

   και

   (β) ένα δείγμα του μολυσμένου υλικού μελιτζάνας το οποίο έχει μολυνθεί τεχνητά με εκχύλισμα κονδύλου ή φυτού·

   και

   (γ) η απομονωμένη καλλιέργεια του οργανισμού,

   για τουλάχιστον ένα μήνα μετά τη διαδικασία κοινοποίησης βάσει της παραγράφου (2) του Κανονισμού 7.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

1. Τα στοιχεία που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη για τον προσδιορισμό της έκτασης της πιθανής μόλυνσης βάσει της υποπαραγράφου (β) της παραγράφου (1) του Κανονισμού 7, περιλαμβάνουν:

(α) Τους κονδύλους ή τα φυτά που παράγονται σε περιοχή παραγωγής χαρακτηρισμένη ως μολυσμένη βάσει της υποπαραγράφου (α) της παραγράφου (1) του Κανονισμού 7,

(β) την (τις) περιοχή(-ές) παραγωγής που έχει δεσμό παραγωγής με τους κονδύλους ή τα φυτά που έχουν χαρακτηρισθεί ως μολυσμένα βάσει της υποπαραγράφου (α) της παραγράφου (1) του Κανονισμού 7, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που χρησιμοποιούν τον ίδιο εξοπλισμό και εγκαταστάσεις παραγωγής απευθείας ή μέσω κοινού αναδόχου,

(γ) τους κονδύλους ή τα φυτά που παράγονται στην ή τις περιοχές παραγωγής που αναφέρονται στην προηγούμενη περίπτωση ή που υπήρχαν σ' αυτή την περιοχή ή περιοχές παραγωγής κατά την περίοδο κατά την οποία οι κόνδυλοι ή τα φυτά που χαρακτηρίζονται ως μολυσμένα βάσει της υποπαραγράφου (α) της παραγράφου (1) του Κανονισμού 7, υπήρχαν στις περιοχές παραγωγής που αναφέρονται στην πρώτη περίπτωση,

(δ) τις κτιριακές εγκαταστάσεις όπου γίνεται επεξεργασία της πατάτας από τις περιοχές παραγωγής που αναφέρονται στις παραπάνω περιπτώσεις,

(ε) κάθε μηχάνημα, όχημα, σκάφος, αποθήκη ή μονάδα αυτών και κάθε άλλο αντικείμενο, συμπεριλαμβανομένων των υλικών συσκευασίας, που ενδέχεται να έχουν έλθει σε επαφή με κονδύλους ή φυτά χαρακτηρισμένα ως μολυσμένα βάσει της υποπαραγράφου (α) της παραγράφου (1) του Κανονισμού 7,

(στ) κάθε κόνδυλο ή φυτό που έχει αποθηκευθεί ή έχει έλθει σε επαφή, με οποιαδήποτε κατασκευή ή αντικείμενο που απαριθμείται στην προηγούμενη περίπτωση, πριν από τον καθαρισμό ή την απολύμανση αυτών των κατασκευών και αντικειμένων,

(ζ) ως αποτέλεσμα των δοκιμών που αναφέρονται στον Κανονισμό 8, εκείνους τους κονδύλους ή τα φυτά με αδελφική ή γονική κλωνική σχέση με τους κονδύλους ή τα φυτά που χαρακτηρίστηκαν μολυσμένα βάσει της υποπαραγράφου (α) της παραγράφου (1) του Κανονισμού 7, και για τους οποίους μολονότι ενδέχεται να έδωσαν αρνητικά αποτελέσματα κατά τις δοκιμές ανίχνευσης του οργανισμού, κρίνεται ότι η μόλυνση είναι πιθανή μέσω κλωνικής σχέσης. Η δοκιμή ποικιλιών μπορεί να διεξαχθεί για την επαλήθευση της ταυτότητας των μολυσμένων και κλωνικά σχετιζομένων κονδύλων ή φυτών·

και

(η) τον ή τους τόπους παραγωγής των κονδύλων ή φυτών που αναφέρονται στην προηγούμενη περίπτωση.

2. Τα στοιχεία που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη για τον προσδιορισμό της πιθανολογούμενης μετάδοσης που αναφέρεται στην υποπαράγραφο (γ) της παραγράφου (1) του Κανονισμού 7, πρέπει να περιλαμβάνουν:

(α) Τη γειτνίαση άλλων περιοχών παραγωγής όπου καλλιεργούνται πατάτες ή άλλα φυτά ξενιστές,

(β) την παραγωγή κοινής πατάτας και χρησιμοποίηση αποθεμάτων πατατόσπορου.

3. Η κοινοποίηση που αναφέρεται στο πρώτο εδάφιο της παραγράφου (2) του Κανονισμού 7 πρέπει να παρέχεται ως ακολούθως:

(α) Αμέσως μετά την επιβεβαίωση της παρουσίας του οργανισμού από τις εργαστηριακές δοκιμές, κάνοντας χρήση των μεθόδων που παρατίθενται στο Παράρτημα Ι, τουλάχιστον:

(i) Την ονομασία της ποικιλίας της παρτίδας πατάτας,

(ii) τον τύπο (πατάτες εμπορίου, πατατόσπορος κ.λπ.) και, όπου είναι εφαρμόσιμο, την κατηγορία του πατατόσπορου,

(β) στις περιπτώσεις που υπάρχει κίνδυνος μόλυνσης της πατάτας από ή εντός άλλου(-ων) κράτους(-ών) μέλους(-ών), το κράτος μέλος στο οποίο επιβεβαιώθηκε εκδήλωση της ασθένειας διαβιβάζει αμέσως στο(-α) ενδιαφερόμενο(-α) κράτος(-η) μέλος(-η) τις πληροφορίες που είναι αναγκαίες προκειμένου να συμμορφωθεί με την παράγραφο (3) του Κανονισμού 7, όπως:

(i) Την ονομασία της ποικιλίας της παρτίδας πατάτας,

(ii) την ονομασία και τη διεύθυνση του αποστολέα και του παραλήπτη,

(iii) την ημερομηνία παραλαβής της παρτίδας πατάτας,

(iv) το μέγεθος της παρτίδας πατάτας που παραλήφθηκε,

(v) αντίγραφο του φυτοϋγειονομικού διαβατηρίου ή τουλάχιστον τον αριθμό του φυτοϋγειονομικού διαβατηρίου όπου χρειάζεται ή τον αριθμό μητρώου του καλλιεργητή ή εμπόρου όπου χρειάζεται και αντίγραφο της ειδοποίησης παράδοσης.

Η Επιτροπή πρέπει να ενημερώνεται αμέσως όταν έχει παρασχεθεί τέτοια πληροφόρηση:

(α) Μετά την ολοκλήρωση όλων των ερευνών, για κάθε περίπτωση:

(i) Την ημερομηνία που επιβεβαιώθηκε η μόλυνση,

(ii) σύντομη περιγραφή της έρευνας που έλαβε χώρα για την ταυτοποίηση της πηγής και την ενδεχόμενη επέκτασή της

μόλυνσης, συμπεριλαμβανομένου του επιπέδου της δειγματοληψίας που πραγματοποιήθηκε,

(iii) πληροφορίες σχετικά με την(-ις) ταυτοποιημένη(-ες) ή πιθανή(-ές) πηγή(-ές) μόλυνσης,

(iv) λεπτομέρειες σχετικά με την έκταση της προσδιορισθείσας μόλυνσης, συμπεριλαμβανομένου του αριθμού χώρων παραγωγής και του αριθμού παρτίδων με ένδειξη της ποικιλίας και, στην περίπτωση πατατόσπορου, της κατηγορίας,

(v) λεπτομέρειες της οριοθέτησης ζώνης, συμπεριλαμβανομένου του αριθμού των περιοχών παραγωγής, που δεν έχουν χαρακτηρισθεί ως μολυσμένες, αλλά συμπεριλαμβάνονται στη ζώνη,

(vi) οποιαδήποτε άλλη πληροφορία σχετική με το επιβεβαιωθέν(-ντα) κρούσμα(-τα), την οποία απαιτεί η Επιτροπή.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

1. Τα επισήμως εποπτευόμενα μέτρα που αναφέρονται στην παράγραφο (1) του Κανονισμού 9 πρέπει να είναι:

   (α) Χρήση ως ζωοτροφή μετά από θερμική επεξεργασία ώστε να μην υπάρχει κίνδυνος επιβίωσης του οργανισμού·

   ή

   (β) διάθεση σε επισήμως εγκεκριμένη τοποθεσία διάθεσης αποβλήτων, στην οποία δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος διαφυγής του παθογόνου στο περιβάλλον, π.χ. μέσω διήθησης σε γεωργικά εδάφη·

   ή

   (γ) καύση

   ή

   (δ) βιομηχανική μεταποίηση μέσω απευθείας και άμεσης παράδοσης σε μεταποιητική μονάδα με επίσημα εγκεκριμένες εγκαταστάσεις διάθεσης αποβλήτων για τις οποίες έχει διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος μετάδοσης του οργανισμού και με σύστημα καθαρισμού και απολύμανσης τουλάχιστον των αναχωρούντων οχημάτων·

   ή

   (ε) άλλα μέτρα, με την προϋπόθεση ότι έχει διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος μετάδοσης του οργανισμού· τα μέτρα αυτά και η αιτιολόγησή τους κοινοποιούνται αμέσως στην Επιτροπή και τα λοιπά κράτη μέλη.

   Όλα τα εναπομείναντα απόβλητα που σχετίζονται και προκύπτουν από τα ανωτέρω διατίθενται με επισήμως εγκεκριμένες μεθόδους σύμφωνα με το Παράρτημα V των Κανονισμών αυτών.

2. Η κατάλληλη χρήση ή διάθεση των κονδύλων ή φυτών που έχουν προσδιορισθεί ως πιθανώς μολυσμένα σύμφωνα με την υποπαράγραφο (β) της παραγράφου (1) του Κανονισμού 7 και αναφέρονται στην παράγραφο (2) του Κανονισμού 9, υπό τον έλεγχο της Αρμόδιας Αρχής, με την κατάλληλη επικοινωνία μεταξύ των αρμόδιων επίσημων φορέων ώστε να εξασφαλίζεται πάντοτε ο έλεγχος αυτός και με την έγκριση της Αρμόδιας Αρχής του κράτους μέλους στο οποίο συσκευάζονται ή μεταποιούνται οι πατάτες όσον αφορά τις εγκαταστάσεις διάθεσης αποβλήτων που αναφέρονται στην πρώτη και τη δεύτερη περίπτωση, πρέπει να είναι:

   (α) Χρήση ως πατάτες εμπορίου προοριζόμενες για κατανάλωση, συσκευασμένες για άμεση παράδοση και χρήση χωρίς νέα συσκευασία, σε χώρο με κατάλληλες εγκαταστάσεις διάθεσης αποβλήτων. Οι πατάτες που προορίζονται για φύτευση μπορούν να υποβληθούν σε επεξεργασία μόνον στον ίδιο χώρο, εάν η επεξεργασία αυτή γίνει χωριστά ή μετά από

καθαρισμό και απολύμανση·

ή

(β) χρήση ως πατάτες εμπορίου προοριζόμενες για βιομηχανική μεταποίηση, που προορίζονται για απευθείας και άμεση παράδοση σε μεταποιητική μονάδα με κατάλληλες εγκαταστάσεις διάθεσης αποβλήτων και με σύστημα καθαρισμού και απολύμανσης τουλάχιστον των αναχωρούντων οχημάτων,

ή

(γ) άλλη χρήση ή διάθεση, με την προϋπόθεση ότι έχει διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος διάδοσης του οργανισμού και υπό την προϋπόθεση της έγκρισης από τους αναφερθέντες αρμόδιους επίσημους φορείς.

3. Οι κατάλληλες μέθοδοι καθαρισμού και απολύμανσης των αντικειμένων που αναφέρονται στην παράγραφο (3) του Κανονισμού 9 πρέπει να είναι αυτές για τις οποίες έχει διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος διάδοσης του οργανισμού και εφαρμόζονται υπό την εποπτεία των αρμοδίων επίσημων φορέων των κρατών μελών.

4. Η σειρά μέτρων που εφαρμόζουν τα κράτη μέλη μέσα στην οριοθετημένη ζώνη που διαπιστώθηκε βάσει την υποπαράγραφο (γ) της παραγράφου (1) του Κανονισμού 7 και αναφέρεται στην παράγραφο (4) του Κανονισμού 9 περιλαμβάνει:

4.1. Σε περιοχές παραγωγής που χαρακτηρίζονται ως μολυσμένες βάσει της υποπαραγράφου (α) της παραγράφου (1) του Κανονισμού 7:

(α) Σε αγρό που χαρακτηρίζεται ως μολυσμένος βάσει της υποπαραγράφου (α) της παραγράφου (1) του Κανονισμού 7 είτε

(i) (αα) κατά τη διάρκεια τουλάχιστον τριών καλλιεργητικών ετών μετά το έτος της προσδιορισθείσας μόλυνσης,

- λαμβάνονται μέτρα για την εξάλειψη των αυτοφυών φυτών πατάτας και άλλων αυτοφυών φυτών που είναι ξενιστές του οργανισμού·

και

- δεν φυτεύονται κόνδυλοι πατάτας, φυτά ή πραγματικοί σπόροι ή άλλα αυτοφυή φυτά που είναι ξενιστές του οργανισμού, ή φυτά για τα οποία υπάρχει εμφανής κίνδυνος διάδοσης του οργανισμού,

(ββ) κατά την πρώτη καλλιεργητική περίοδο πατάτας μετά την περίοδο που εξειδικεύεται στην προηγούμενη περίπτωση και υπό τον όρο ότι ο αγρός έχει βρεθεί απαλλαγμένος από

αυτοφυή φυτά πατάτας και άλλα αυτοφυή φυτά που είναι ξενιστές του οργανισμού κατά τη διάρκεια επίσημων επιθεωρήσεων για τα δύο τουλάχιστον συνεχή καλλιεργητικά έτη πριν από τη φύτευση, επιτρέπεται μόνον η παραγωγή πατατών εμπορίου και οι συγκομιζόμενοι κόνδυλοι πρέπει να ελέγχονται σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται λεπτομερώς στο Παράρτημα Ι,

(γγ) κατά την πρώτη καλλιεργητική περίοδο πατάτας μετά την περίοδο που καθορίζεται στην προηγούμενη περίπτωση και σύμφωνα με ένα κατάλληλο σύστημα αμειψισποράς, που θα είναι τουλάχιστον δύο έτη εάν πρόκειται να καλλιεργηθεί πατατόσπορος, φυτεύονται πατάτες για παραγωγή είτε πατατόσπορου είτε πατάτας εμπορίου και πραγματοποιείται επίσημη εξέταση όπως καθορίζεται στην παράγραφο (1) του Κανονισμού 4 ή

(ii) (αα) κατά τη διάρκεια τεσσάρων καλλιεργητικών ετών μετά την περίοδο της προσδιορισθείσας μόλυνσης,

- λαμβάνονται μέτρα για την εξάλειψη των αυτοφυών φυτών πατάτας και άλλων αυτοφυών φυτών που είναι ξενιστές του οργανισμού·

και

- ο αγρός διατηρείται είτε χέρσος είτε ως μόνιμος βοσκότοπος στον οποίο, η βλάστηση κόβεται συχνά και χαμηλά ή ο οποίος χρησιμοποιείται για εντατική βόσκηση,

(ββ) κατά την πρώτη καλλιεργητική περίοδο πατάτας μετά την περίοδο που καθορίζεται στην προηγούμενη περίπτωση και υπό τον όρο ότι ο αγρός έχει βρεθεί απαλλαγμένος από αυτοφυή φυτά πατάτας και άλλα αυτοφυή φυτά που είναι ξενιστές του οργανισμού κατά τη διάρκεια επίσημων επιθεωρήσεων για τα δύο τουλάχιστον συνεχή καλλιεργητικά έτη πριν τη φύτευση, επιτρέπεται μόνον η παραγωγή πατατόσπορου ή πατάτας εμπορίου και οι συγκομιζόμενοι κόνδυλοι ελέγχονται σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται λεπτομερώς στο Παράρτημα Ι·

(β) σε όλους τους άλλους αγρούς της μολυσμένης περιοχής παραγωγής και εφόσον η Αρμόδια Αρχή κρίνει ότι έχει εξαλειφθεί ο κίνδυνος μετάδοσης του οργανισμού από αυτοφυή φυτά πατάτας και άλλα αυτοφυή φυτά που βρέθηκαν να είναι ξενιστές του οργανισμού:

(i) Το καλλιεργητικό έτος μετά την προσδιορισθείσα μόλυνση είτε δεν φυτεύονται κόνδυλοι, φυτά ή πραγματικοίσπόροι πατάτας ή άλλα αυτοφυή φυτά που βρέθηκαν να είναι ξενιστές του οργανισμού ή

(αα) μπορεί να φυτευθεί επισήμως πιστοποιημένος πατατόσπορος μόνον για παραγωγή πατάτας εμπορίου,

(ii) κατά το δεύτερο καλλιεργητικό έτος μετά την περίοδο της προσδιορισθείσας μόλυνσης φυτεύεται για παραγωγή πατατόσπορου ή πατάτας εμπορίου μόνον επισήμως πιστοποιημένος πατατόσπορος ή πατατόσπορος που έχει υποβληθεί σε επίσημο έλεγχο για την απουσία της δακτυλιωτής σήψης και έχει καλλιεργηθεί υπό επίσημο έλεγχο σε διαφορετικούς χώρους παραγωγής από αυτούς που αναφέρονται στο σημείο 4.1,

(iii) για τουλάχιστον το τρίτο καλλιεργητικό έτος μετά την περίοδο της προσδιορισθείσας μόλυνσης, μόνον επισήμως πιστοποιημένος πατατόσπορος ή πατατόσπορος που καλλιεργείται υπό επίσημο έλεγχο από επισήμως πιστοποιημένο πατατόσπορο φυτεύεται για παραγωγή πατατόσπορου ή πατάτας εμπορίου,

(iv) κατά τη διάρκεια όλων των καλλιεργητικών ετών που αναφέρονται στις προηγούμενες περιπτώσεις, λαμβάνονται μέτρα για την εξάλειψη των αυτοφυών φυτών πατάτας ή άλλων αυτοφυών φυτών που βρέθηκαν να είναι ξενιστές του οργανισμού, εάν υπάρχουν, και διεξάγεται σε κάθε αγρό καλλιέργειας πατάτας επίσημος έλεγχος των συγκομισθέντων πατατών σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στο Παράρτημα Ι·

(γ) αμέσως μετά τον χαρακτηρισμό μόλυνσης σύμφωνα με την υποπαράγραφο (α) της παραγράφου (1) του Κανονισμού 7 και μετά το πρώτο επόμενο καλλιεργητικό έτος, καθαρίζονται και απολυμαίνονται κατάλληλα όλα τα μηχανήματα και οι αποθηκευτικοί χώροι στον χώρο παραγωγής που έχουν σχέση με την παραγωγή πατάτας με τις κατάλληλες μεθόδους όπως ορίζεται στο σημείο 3·

(δ) σε μονάδα προστατευόμενης φυτικής παραγωγής όπου είναι δυνατή η πλήρης αντικατάσταση του υποστρώματος βλάστησης,

(i) δεν φυτεύονται κόνδυλοι, φυτά ή πραγματικοί σπόροι παρά μόνον εάν στη μονάδα παραγωγής εφαρμόζονται επισήμως εποπτευόμενα μέτρα για την εξάλειψη του οργανισμού και την απομάκρυνση όλου του υλικού των φυτών ξενιστών, συμπεριλαμβανομένης, τουλάχιστον, μιας πλήρους αντικατάστασης του υποστρώματος βλάστησης και του καθαρισμού και της απολύμανσης της μονάδας παραγωγής και όλου του εξοπλισμού, και, στη συνέχεια έχει χορηγηθεί άδεια για παραγωγή πατάτας από τους αρμόδιους επίσημους φορείς·

και

(ii) η παραγωγή πατάτας γίνεται από πιστοποιημένο πατατόσπορο ή από μικροκονδύλους ή μικροφυτά που προέρχονται από ελεγχθείσες πηγές·

4.2. Εντός της οριοθετημένης ζώνης, με την επιφύλαξη των μέτρων που περιγράφονται στο σημείο 4.1, η Αρμόδια Αρχή:

(α) Αμέσως μετά την προσδιορισθείσα μόλυνση, εξασφαλίζεται ότι όλα τα μηχανήματα και οι αποθηκευτικοί χώροι σε τέτοιες εγκαταστάσεις που συνδέονται με την παραγωγή πατάτας καθαρίζονται και απολυμαίνονται κατάλληλα, με τις ενδεδειγμένες μεθόδους, όπως ορίζεται στο σημείο 3·

(β) αμέσως, και για τρεις τουλάχιστον καλλιεργητικές περιόδους μετά την προσδιορισθείσα μόλυνση:

(i) Εξασφαλίζει, μέσω των αρμόδιων επίσημων φορέων της, την εποπτεία των χώρων που καλλιεργούνται, αποθηκεύονται ή διακινούνται κόνδυλοι πατάτας, καθώς και των χώρων στους οποίους λειτουργούν, βάσει σύμβασης, μηχανήματα για τις πατάτες,

(ii) απαιτούν τη φύτευση αποκλειστικά πιστοποιημένου σπόρου ή σπόρου που έχει παραχθεί υπό επίσημο έλεγχο για όλες τις καλλιέργειες πατάτας της ζώνης αυτής, και δοκιμή, μετά τη συγκομιδή, του πατατόσπορου που παράγεται σε τόπους παραγωγής που έχουν χαρακτηριστεί ως πιθανώς μολυσμένοι, σύμφωνα με την υποπαράγραφο (β) της παραγράφου (1) του Κανονισμού 7,

(iii) απαιτούν τη χωριστή διακίνηση των αποθεμάτων συγκομισθέντος πατατόσπορου και πατάτας εμπορίου για όλες τις εγκαταστάσεις της ζώνης ή ένα σύστημα καθαρισμού και απολύμανσης που θα πρέπει να εφαρμοσθεί μεταξύ της διακίνησης των αποθεμάτων σπόρου και πατάτας εμπορίου,

(iv) διενεργούν επίσημη εξέταση όπως περιγράφεται στην παράγραφο (1) του Κανονισμού 4·

(γ) καταρτίζει, κατά περίπτωση, πρόγραμμα αντικατάστασης όλων των αποθεμάτων πατατόσπορου σε εύθετο χρονικό διάστημα.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V

Οι επίσημα εγκεκριμένες μέθοδοι διάθεσης αποβλήτων που αναφέρονται στο Παράρτημα IV παράγραφος (1) είναι σύμφωνες με τις ακόλουθες διατάξεις έτσι ώστε να αποτραπεί οποιοσδήποτε εμφανής κίνδυνος διάδοσης του οργανισμού:

(i) Τα απόβλητα πατάτας (συμπεριλαμβανομένων των απορρίψεων πατατών και του φλοιού πατάτας) και οποιοδήποτε άλλο στερεό απόβλητο που προέρχεται από πατάτες (συμπεριλαμβανομένου του χώματος, των πετρών και άλλων υπολειμμάτων) πρέπει να απομακρύνονται είτε με,

(αα) διάθεση σε επισήμως εγκεκριμένο και ειδικό χώρο διάθεσης αποβλήτων όπου δεν υφίσταται εμφανής κίνδυνος διαφυγής του οργανισμού στο περιβάλλον, π.χ. μέσω της διήθησης σε γεωργικά εδάφη. Τα απόβλητα μεταφέρονται απευθείας στον εν λόγω χώρο υπό συνθήκες περιορισμού, έτσι ώστε να μην υπάρχει κίνδυνος απώλειας των αποβλήτων·

ή

(ββ) καύση,

ή

(γγ) άλλα μέτρα, με την προϋπόθεση ότι έχει διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος μετάδοσης του οργανισμού· τα μέτρα αυτά πρέπει να κοινοποιούνται στην Επιτροπή και τα άλλα κράτη μέλη·

(ii) υγρά απόβλητα: πριν από τη διάθεσή τους, τα υγρά απόβλητα που περιλαμβάνουν αιωρούμενα στερεά στοιχεία υποβάλλονται σε διαδικασίες διήθησης ή καθίζησης για την απομάκρυνση αυτών των στερεών στοιχείων. Η διάθεση των στερεών αυτών στοιχείων γίνεται με τους τρόπους που προβλέπονται στο σημείο (i).

Τα υγρά απόβλητα πρέπει είτε:

(αα) να θερμαίνονται τουλάχιστον σε 60 °C καθ' όλο τον όγκο επί τουλάχιστον 30 λεπτά πριν από τη διάθεσή τους·

ή

(ββ) να διατίθενται με άλλο τρόπο που έχει εγκριθεί επισήμως και υπό επίσημο έλεγχο, ώστε να μην υπάρχει εμφανής κίνδυνος επαφής των αποβλήτων με γεωργικά εδάφη. Οι λεπτομέρειες των μέτρων αυτών κοινοποιούνται στα άλλα κράτη μέλη και την Επιτροπή.

Οι επιλογές που παρατίθενται στο παρόν Παράρτημα ισχύουν επίσης για τα απόβλητα που έχουν σχέση με τη διαχείριση, διάθεση και επεξεργασία μολυσμένων παρτίδων.

ΦΩΤΗΣ ΦΩΤΙΟΥ,
Υπουργός Γεωργίας, Φυσικών Πόρων
και Περιβάλλοντος.