

ШЕМА ТЕСТИРАЊА ЗА ДИЈАГНОСТИКУ, ДЕТЕКЦИЈУ И ИДЕНТИФИКАЦИЈУ ПРОУЗРОКОВАЧА ПРСТЕНАСТЕ ТРУЛЕЖИ КРОМПИРА

Поглавље I

ОБЛАСТ ПРИМЈЕНЕ ШЕМЕ ТЕСТИРАЊА

Приказана шема тестирања описује различите поступке укључене у:

- 1) дијагнозу прстенасте трулежи на кртолама и биљкама кромпира,
- 2) детекцију *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* у узорцима кртола кромпира и биљкама,
- 3) идентификацију *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*C. m.* subsp. *sepedonicus*).

Поглавље II

ОПШТА НАЧЕЛА

У поглављима III-XI овог прилога налазе се стандардни протоколи за поједине методе, потврђени и одобрени реагенси и појединости везане за припрему материјала за тестирање и референтног материјала. У Поглављу III овог прилога налази се и списак лабораторија укључених у процес оптимизације и валидације протокола.

С обзиром на то да протоколи укључују методе детекције карантинског организма, што подразумева и употребу живих референтних култура *C. m.* subsp. *sepedonicus*, процедура се мора изводити у прописаним карантинским условима са одговарајућим објектима за одлагање, чување и уништавање отпада у складу са Правилником.

Параметри тестирања морају обезбиједити уједначене и поновљиве нивое детекције *C. m.* subsp. *sepedonicus* према прописаним праговима осјетљивости појединих метода.

Обавезна је прецизна припрема позитивних контрола.

Тестирање у складу са захтијеваним прагом осјетљивости подразумева правилно постављање, одржавање и калибрисање опреме, пажљиво руковање и чување реагенаса, као и предузимање мјера за спречавање контаминације између узорака, нпр. ра-

здвајање позитивних контрола од узорака за тестирање. Да би се избјегле административне или друге грешке, морају се примјенивати стандарди контроле квалитета, посебно при означавању узорака и вођењу документације.

Сумња на присуство патогена у узорку подразумева позитиван резултат теста провјере узорака, као што је приказано у дијаграму тока.

Ако је резултат првог теста провјере (IF или PCR/FISH) позитиван, тада се сумња на присуство *C. m. subsp. sepedonicus* и потребно је примјенити и други тест провјере. Ако је резултат и другог теста позитиван, тада је сумња потврђена и тестирање се наставља према описаној шеми. Ако је резултат другог теста негативан, тада се сматра да *C. m. subsp. sepedonicus* није присутан у узорку.

Позитиван резултат IF теста дефинише се као позитивно очитавање IF теста потврђено и другим тестом провјере (PCR/FISH).

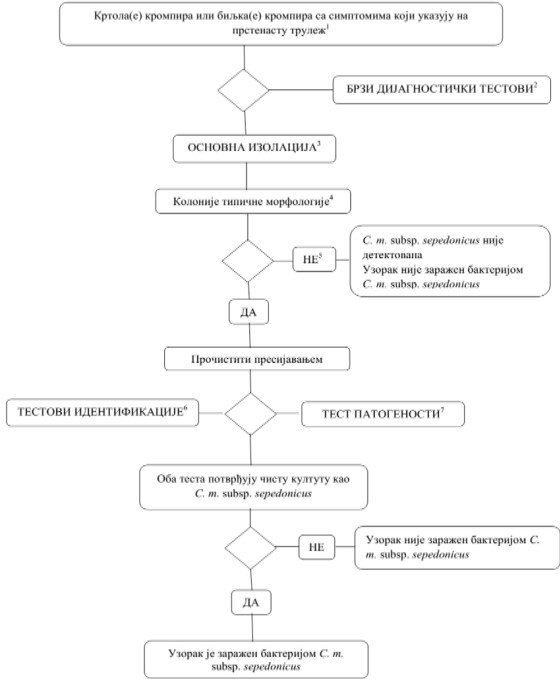
Потврђено присуство патогена подразумева изолацију и идентификацију чисте културе *C. m. subsp. sepedonicus* и потврду патогености.

1. Приказ дијаграма тока

1.1. Шема утврђивања присуства проузроковача прстенасте трулежи у кртолама и биљкама кромпира са типичним симптомима прстенасте трулежи (Шема 1)

Поступак тестирања се примјењује за кртоле и биљке кромпира са типичним симптомима или симптомима који изазивају сумњу на присуство проузроковача прстенасте трулежи. Поступак укључује тест провјере, изолацију патогена из зараженог спроводног ткива на хранљиву подлогу и, у случају позитивног резултата, идентификацију чисте културе *C. m. subsp. sepedonicus*.

Шема 1.



- 1) Опис симптома наведен је у тачки 2. овог поглавља.
- 2) Одговарајући тестови су:
 - IF тест (тачка 4. овог поглавља),
 - PCR тест (тачка 6. овог поглавља),
 - FISH тест (тачка 5. овог поглавља).
- 3) Иако је изолација патогена из биљног материјала са типичним симптомима примјеном методе разријеђења и засијавања на хранљиву подлогу једноставна, овај поступак може бити значајно отежан у узорцима у подмаклој фази инфекције. Сапрофитне бактерије које се развијају на обољелом ткиву могу прерасти или инхибирати патогена на хранљиву подлогу. Зато се препоручује коришћење и неселективне и селективне хранљиве подлоге (најбоље MTNA) или примјена биолошког теста из тачке 7. овог поглавља.
- 4) Опис типичне морфологије колоније наведен је у тачки 8. овог поглавља.

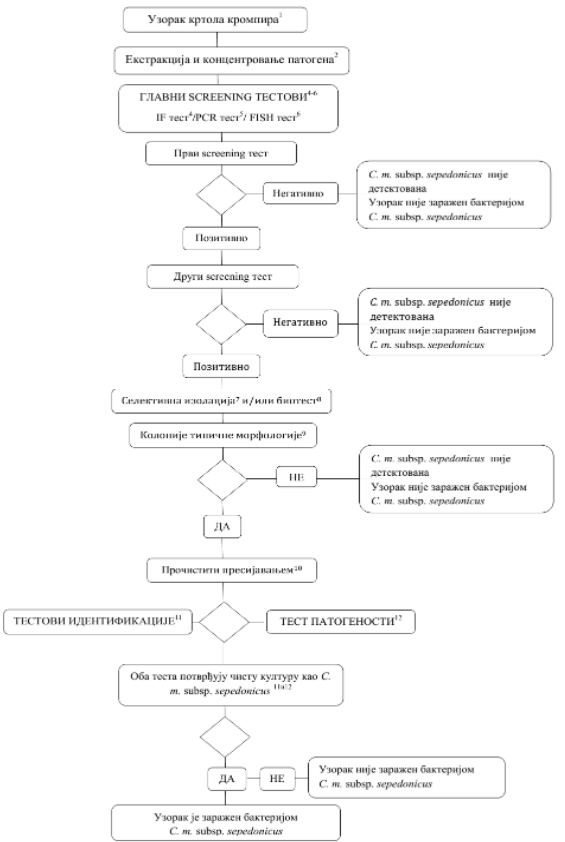
5) Ако је резултат изолације негативан, а симптомима болести типични, тада је потребно поновити поступак изолације патогена.

6) Поуздана идентификација чисте културе *C. m. subsp. sepedonicus* постиже се примјеном тестова наведених у тачки 9. овог поглавља.

7) Тест патогености описан је у тачки 10. овог поглавља.

1.2. Шема за утврђивање присуства и идентификацију *C. m. subsp. sepedonicus* у узорцима кртола кромпира без видљивих симптома (Шема 2)

Шема 2.



- 1) Стандардна величина узорака је 200 кртола, а ако на располагању нема 200 кртола, поступак се може спровести и на мањим узорцима.
- 2) Методе екстракције и концентровања патогена описане су у тачки 3. овог поглавља.
- 3) Ако су резултати најмање два теста који су засновани на различитим биолошким начелима позитивни, потребно је извршити изолацију и потврдити присуство патогена. Извршити бар један тест провјере. Када је резултат теста негативан, сматра се да је узорак негативан. У случају да је резултат тог теста позитиван, потребно је извршити други или више тестова провјере који су засновани на различитим биолошким начелима да би се потврдио позитиван резултат. Ако су резултати осталих тестова негативни, сматра се да је тај узорак негативан. Даље тестирање није потребно.
- 4) Тест имунофлуоресценције (IF) - користити поликловална антибијела за IF тест, а додатна монокловална антибијела омогућавају већу специфичност (тачка 4. овог поглавља).
- 5) PCR тест - користити потврђене и одobreне реагенси и протоколе за PCR (тачка 6. овог поглавља).
- 6) FISH тест - користити потврђене реагенси и протоколе (тачка 5. овог поглавља).
- 7) Селективна изолација: У многим случајевима коришћење MTNA или NCP-88 хранљивих подлога и 1/100 разријеђења ресуспендованог талога је одговарајућа метода за директну изолацију *C. m. subsp. sepedonicus*. Типичне колоније се појављују три до десет дана после засијавања на хранљиву подлогу, када их је могуће пречистити и идентификовати патогена. Пажљивим вађењем и припремом конуса пупчаног дијела кртоле кромпира избјегава се

појава сапрофитних бактерија у кртола кромпира, које на хранљивој подлози конкуришу колонији *C. m. subsp. sepedonicus* и могу је прерастати. Ако се патоген не може изоловати на хранљивој подлози, потребно је поновити поступак изолације коришћењем биљака из биолошког теста (тачка 8. овог поглавља).

8) Биолошки тест се користи за изолацију *C. m. subsp. sepedonicus* из екстракта селективним обogaњивањем у биљкама плавог патлидана (*Solanum melongena*). Тест захтијева оптималне услове инкубације као што је наведено у овој методи. Током пријеме овог теста, највјероватније је да неће доћи до појаве бактерија које инхибирају раст и развој *C. m. subsp. sepedonicus* на хранљивим подлогама MTNA или NCP-88 (тачка 7. овог поглавља).

9) Типична морфологија колоније описана је у тачки 8. овог поглавља.

10) Гајење бактеријске културе или биолошки тест могу бити неуспјешни због компетиције или инхибиције сапрофитним бактеријама. Ако се у тестовима провере добију јасно позитивни резултати, а резултати изолације су негативни, поновити тестове изолације из истог ресуспендованог талога или поновити узимање спроводног ткива на мјесту везивања столона код кртола из истог узорка и, ако је потребно, тестирати додатне узорке.

11) Поуздана идентификација чистих култура *C. m. subsp. sepedonicus* постиже се извођењем тестова описаних у тачки 9. овог поглавља.

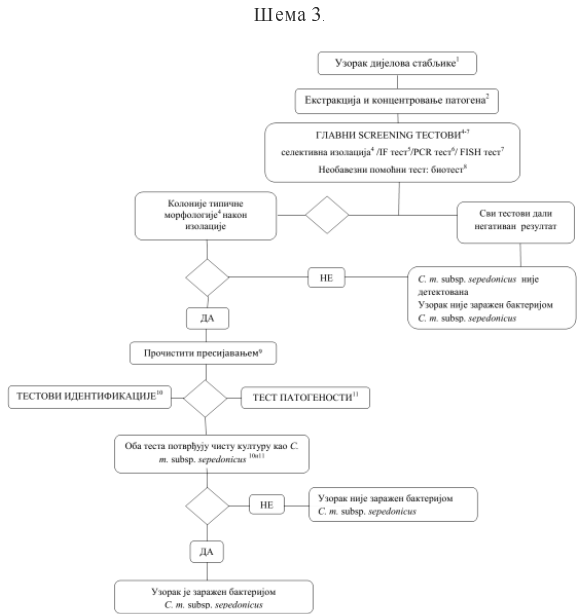
12) Тест патогености описан је у тачки 10. овог поглавља.

Начело - Поступак тестирања намијењен је за откривање присуства скривене паразе у кртолама кромпира.

Позитиван резултат најмање два теста провере, заснован на различитим биолошким начелима, допуњује се изолацијом патогена, послје чега, у случају изолације типичних колонија, слиједи потврда чисте културе *C. m. subsp. sepedonicus*. Позитиван резултат само једног од тестова провере није довољан да би се узорак сматрао вјероватно зараженим.

Тестови провере и изолација морају омогућити ниво осјетљивости детекције 10^3 до 10^4 ћелија/ml ресуспендованог талога, укљученог као позитиван контрола у свакој серији тестова.

1.3. Шема за утврђивање присуства и идентификацију *C. m. subsp. sepedonicus* у узорцима биљака кромпира без симптома (Шема 3)



1) Препоручене величине узорака наведене су у тачки 3. подтачка 3.2. овог поглавља.

2) Екстракција патогена и методе концентровања описане су у тачки 3. подтачка 3.2. овог поглавља.

3) Ако су резултати најмање два теста који су засновани на различитим биолошким начелима позитивни, потребно је извршити изолацију и потврду присуства патогена. Извршити бар један тест провере. Када је резултат теста негативан, сматра се да је узорак негативан. У случају да је резултат тог теста позитиван, потребно је извршити други или више тестова провере који су засновани на различитим биолошким начелима да би се потврдио позитиван

резултат. Ако су резултати осталих тестова негативни, сматра се да је тај узорак негативан. Даље тестирање није потребно.

4) Селективна изолација и типична морфологија колоније описани су у тачки 8. овог поглавља.

5) IF тест описан је у тачки 4. овог поглавља.

6) PCR тестови описани су у тачки 6. овог поглавља.

7) FISH тест описан је у тачки 5. овог поглавља.

8) Биолошки тест описан је у тачки 7. овог поглавља.

9) Гајење бактеријске културе или биолошки тест могу бити неуспјешни због компетиције или инхибиције сапрофитним бактеријама. Ако се у тестовима провере добију јасно позитивни резултати, а резултати изолације су негативни, поновити тестове изолације из истог ресуспендованог талога или поновити узимање спроводног ткива на мјесту везивања столона код кртола из истог узорка и, ако је потребно, тестирати додатне узорке.

10) Поуздана идентификација чистих култура *C. m. subsp. sepedonicus* постиже се извођењем тестова описаних у тачки 9. овог поглавља.

11) Тест патогености описан је у тачки 10. овог поглавља.

2. Визуелни преглед за откривање симптома прстенасте трулежи

2.1. Биљке кромпира

У европским климатским условима симптоми се ријетко проналазе у пољу, и то често тек на крају сезоне. Осим тога, симптоми су често прикривени или се могу замијенити са симптомима других биљних болести, стајења биљака или механичким оштећењима. Зато се симптоми могу врло лако превидјети приликом прегледа у пољу. Симптоми унутрашњих разликују се од оних код проузроковача мрке трулежи, унутрашње је обично споро и у почетку ограничено на ивице листова. Млади заражени листови често настављају раст, мада у зараженим дијеловима спорије, што доводи до формирања листова необичног облика. Због блокаде спроводног ткива у доњем дијелу стабљике, на листовима се између лисних нерва често појављују хлоротичне, жуто-наранџасте површине. Временом пропадају заражени дијелови листа, листови, па чак и стабљике. Често долази само до смањења величине листова и кртола. Повремено су биљке закржљале.

2.2. Кртоле кромпира

У најранијој фази појаве симптома ткиво кртоле је стакласто или прозирно, без омекшавања око спроводног ткива, посебно у близини пупчаног дијела кртоле. У пупчаном дијелу кртоле, прстен спроводног система може бити мало тамнији од уобичајеног. Први лако уочљив симптом је жућкаста боја спроводног прстена, а када се кртола благо тисне, из спроводних судова излазе мале количине материје сирасте конзистенције, која садржи милионе бактерија. Могућ је развој појаве браон (смеђе, мрке) боје спроводног ткива и симптоми на кртоли су у овом стадијуму слични симптомима мрке трулежи коју проузрокује *Ralstonia solanacearum*. У почетку, симптоми су ограничени на један дио спроводног прстена, не обавезно близу пупка, а касније се постепено проширују на цијели прстен. Како инфекција напредује, долази до потпуног пропадања спроводног ткива; спољни и унутрашњи дио кртоле могу се раздвојити. У каснијим фазама инфекције на површини кртола појављује се пукотине, које су често црвенкасто-смеђе боје по ивицама. Недавно је у Европи забиљежено неколико случајева појаве симптома гдје је средиште кртоле трнуло истовремено са спроводним прстеном, што је довело до секундарног напада патогена са стварањем унутрашњих шупљина и некроза. Присуство секундарних гљива или бактерија може прикрити симптоме, услед чега може бити тешко, чак и немогуће, разликовати узнапредовале симптоме прстенасте трулежи од других трулежи кртола. Могућа је појава и нетипичних симптома прстенасте трулежи.

3. Припрема узорака

3.1. Кртоле кромпира

Напомена

1. стандардна величина узорака је 200 кртола по тесту. Интензивније узorkовање захтијева извођење већег броја тестова на узорцима те величине. Већи број кртола у узорку довешће до инхибиције или ће отежати тумачење резултата. Када је на располагању мање кртола, поступак се може примјенити и за узорке са мање од 200 кртола;

2. валидација свих метода за утврђивање присуства патогена, које су описане у даљем тексту, базира се на тестирању узорака од 200 кртола;

3. екстракт кромпира који је описан у даљем тексту може се користити и за утврђивање присуства проузроковача мрке трулежи кромпира бактерије *Ralstonia solanacearum*.

Процедура која претходи припреми узорака: опрати кртоле, употребити одговарајућа дезинфекциона средства (при ко-

Употреба PCR теста употријебити јединица хлора ради уклањања евентуално присутног ДНК патогена) и детергенте између сваког узорка, те осушити кртоле на ваздуху.

Поступак прања је посебно користан, али не и обавезан за случајеве обраде узорака са већом количином земље при извођењу PCR теста или процедуре директне изолације.

3.1.1. Чистим и дезинфикованим скапелом или ножем за поврће уклонити пожожицу са пупчаног дијела кртоле тако да се виде спроводни судови. Пажљиво изрезати мали конусни дио спроводног ткива на пупчаном дијелу, захватајући што мање околног, неспроводног ткива.

Напомена

- све кртоле са потенцијално сумњивим симптомима прстенасте трулежи одвојити посебно и тестирати;

- ако се приликом вађења конуса из пупчаног дијела уоче потенцијални симптоми прстенасте трулежи, кртоле треба визуелно прегледати. Сваку пресећену кртолу са оваквим симптомима треба оставити два дана на собној температури, а потом чувати у карантинским условима (на 4 °C до 10 °C) до спровођења тестирања. Све кртоле у узорку (укључујући и оне са сумњивим симптомима) треба чувати на начин прописан овим правилником.

3.1.2. Извађене конусе из пупчаног дијела кртоле који садрже дијелове спроводног ткива ставити у стерилне посуде које се могу запечатити и/или херметички затворити (ако су посуде већ употребљаване, морају се темељно очистити и дезинфиковати употребом средстава на бази једињења хлора). Узорке је пожељно одмах обрадити. Ако то није могуће, потребно је чувати их у посуди без додатка пуфера, најдуже 72 часа у фрижидеру или најдуже 24 часа на собној температури. Током чувања долази до сушења и суберијације сржног дијела конуса, као и до раста и развоја сапрофита, што може ометати утврђивање присуства бактерије проузрокована прстенасте трулежи.

3.1.3. Извађене конусе из пупчаног дијела кртоле обрадити коришћењем једног од следећих поступака:

а) извађене конусе прекрити довољном количином (око 40 ml) екстракционог пуфера (Поглавље V овог прилога) и центрифугирати на 50 до 100 обртаја/мин. четири часа на температури испод 24 °C или од 16 до 24 часа уз хлађење;

б) извађене конусе хомогенизовати са довољном количином (око 40 ml) екстракционог пуфера (Поглавље V овог прилога), било у мјешалици (нпр. Waring или Ultra Thurax) било дробљењем у затвореној кеси за мацерацију за једнократну употребу (нпр. кесе Stomacher или Bioreba од чврстог политена, 150 mm - 250 mm, стерилизоване зрачењем), користећи гумени чекић или одговарајући апарат за мацерирање (нпр. Nometex).

Напомена

Ако се узорци хомогенизују у блендеру, постоји велика опасност од њихове унакрсне контаминације. Предузети мјере опреза са циљем спречавања настајања аеросола или просипања током екстракције. За сваки узорак употребијте стерилизоване ножице и посуде. Током процедуре PCR, спријечити пренос ДНК на контејнере или апаратуру за мацерирање. За PCR тест препоручује се мацерирање узорака у кесicama за једнократну употребу и даље коришћење епрувета и туба за једнократну употребу.

3.1.4. Одлити супернатант. Ако је превише мутан, раздистриги га ултрацентрифугирањем на мањем броју обртаја (највише 180 g, 10 минута на температури од 4 °C до 10 °C) или вакуумском филтрацијом (40 µm до 100 µm), током које се филтер додатно испира екстракционим пуфером (око 10 ml) - (Поглавље V овог прилога).

3.1.5. Извршити концентрисање фракције бактерије центрифугирањем на 7.000 g 15 минута (или 10.000 g 10 минута) на температури од 4 °C до 10 °C, после чега се пажљиво, без мијешања са талогом, одлива супернатант.

3.1.6. Ресуспендовати талог у 1,5 ml пелет пуфера (пуфера за раставање талогом), (Поглавље V овог прилога). Од ове количине користити 500 µl за тестирање на присуство *C. m. subsp. sepedonicus*, 500 µl за тестирање на присуство *Ralstonia solanacearum* и 500 µl као референтни материјал за чување. У последњим, референтни дио од 500 µl додати стерилни глицерол у коначној концентрацији од 10% до 25% (v/v), промијешати и чувати на температури од -16 °C до -24 °C (недјељама) или на температури од -68 °C до -86 °C (мјесецима). Дијелове одвојене за утврђивање присуства бактерије током тестирања чувати на температури од 4 °C до 10 °C. Не препоручује се вишеструко замрзавање и одмрзавање. У случају потребе за транспортом узорака, узорке доставити у преносивом фрижидеру у року од 24 до 48 часова.

3.1.7. Важно је да се све позитивне контроле *C. m. subsp. sepedonicus* и узорци држе одвојено да би се избегла контаминација. Ово се односи и на IF плочице и друге тестове.

3.2. Биљне кромпира

Напомена

За откривање латентних популација *C. m. subsp. sepedonicus* препоручује се тестирање збирних узорака. Поступак се може погоднио примјенити на збирне узорке са највише 200 дијелова стабљике (узимање узорака током спровођења надзора се мора заснивати на статистички репрезентативном узорку испитиване биљне популације).

3.2.1. Чистим дезинфикованим ножем или маказама за резидбу одрезати 1 cm до 2 cm донег дијела сваке стабљике, одмах изнад површине земљишта. Дијелове стабљике дезинфиковати кратким потапањем у 70% етанола и одмах осушити улијајућим папиром. Ставити дијелове стабљике у затворену стерилну посуду.

3.2.2. Обрадити дијелове стабљике помоћу једног од следећих поступака:

а) дијелове стабљике прекрити довољном количином (приближно 40 ml) екстракционог пуфера (Поглавље V овог прилога) и ултрацентрифугирати на 50 до 100 обрт/мин четири часа на температури испод 24 °C или 16 до 24 часа уз хлађење;

б) дијелове стабљике измацерирати у чврстој кеси за мацерацију (нпр. Stomacher или Bioreba) са одговарајућом количином екстракционог пуфера (Поглавље V овог прилога), користећи гумени чекић или одговарајућу опрему за мацерирање (нпр. Nometex). Ако то није могуће, дијелове стабљике чувати у фрижидеру најдуже 72 часа или на собној температури најдуже 24 часа.

3.2.3. Након 15 минута таложења, одлити супернатант.

3.2.4. Даље избистравање екстракта или концентровање фракције бактерија обично није потребно, али се може постићи филтрирањем и/или центрифугирањем.

3.2.5. Подијелити чисти или концентровани екстракт узорака на два једнака дијела. Једну половину чувати на температури од 4 °C до 10 °C током тестирања, а другу половину оставити за случај употребе у додатним тестирањима: у екстракт се додаје од 10% до 25% (v/v) стерилног глицерола и чува на температури од -16 °C до -24 °C (недјељама) или на температури од -68 °C до -86 °C (мјесецима).

4. IF тест

Начело: Употреба IF теста као главног теста провере препоручује се због његове доказане уједначености у постизању захтијеваних прагова осјетљивости методе.

Када се IF тест користи као главни тест провере и ако је IF читавање позитивно, додатно се као други тест користи PCR или FISH тест. Када се IF тест користи као други тест провере и IF читавање је позитивно, даља тестирања с циљем комплетирања анализа се изводе према дијаграму тока.

Напомена

Када се IF тест користи као главни тест провере, увијек користити поликлонална антибијела. У случају позитивног IF читавања с поликлоналним антибијелима, даља провера употребом моноклоналних антибијела може повећати специфичност, али и умањити осјетљивост теста.

Употријебити антибијела за референтни сој *C. m. subsp. sepedonicus*. Препоручује се одређивање титра за сваку нову серију антибијела. Титар се дефинише као највеће разријеђење у коме долази до оптималне реакције при тестирању суспензије која садржи 10⁵ до 10⁶ ћелија по ml одговарајућег соја *C. m. subsp. sepedonicus* уз коришћење флуоресценц-изотиоцијанат (FITC) конјугата у складу с препорукама произвођача. Неразријеђена поликлонална и моноклонална антибијела треба да имају IF титар најмање 1 : 2.000. Током тестирања користити радна разријеђена антибијела, која су близу или једнака титру. Користити потврђена и одобрена антибијела.

Тестирање треба извршити на свјеже припремљеним екстрактима узорака, а по потреби, тестирање се може успјешно извршити и на екстрактима који су били чувани на температури од -68 °C до -86 °C са додатком глицерола. Глицерол уклонити додавањем 1 ml пелет пуфера (пуфера за раставање талогом), поновним центрифугирањем на 7.000 g у трајању од 15 минута и ресуспендовати талог у једнакој запремини пелет пуфера. Овај дио процедуре често није потребан, нарочито ако су узорци фиксирани на микроскопска IF стакла пламеном.

На одвојеним микроскопским стаклима припремити позитивну контролу, и то хомологни или неки други референтни изолат *C. m. subsp. sepedonicus*, растворен у екстракту кромпира и по избору у пуферу.

На истој IF плочици треба, гдје год је то могуће, користити и позитивну контролу коју чини природно заражено ткиво (лиофилизовано или замрзнуто на температури од -16 °C до -24 °C).

Негативну контролу могу представљати и дијелови екстракта узорака који су у ранијем тестирању показали негативан резултат.

Користити микроскопске плочице са више бунарчића, по могућности са 10 отвора пречника најмање 6 mm.

Примјењити идентичан поступак тестирања на узорке и на позитивне и негативне контроле.

4.1. Припремити IF плочице за тестирање једним од следећих поступака:

а) за талог са релативно малом количином наталоженог скроба: у први бунарчић пипетом одмјерити стандардну запремину разријеђења од 1/100 ресуспендованог талога кромпира (15 µl је довољно за бунарчиће пречника 6 mm - повећати запремину за веће бунарчиће). Потом, у остале бунарчиће у истом реду пипетом одмјерити сличну запремину неразријеђене суспензије (1/1) талога. Други ред може се користити као дупликат првог или за други узорак као што је приказано на Шеми 4;

б) за остале суспензије талога: припремити децимална разријеђења (1/10 и 1/100) ресуспендованог талога у пуферу за талог. У један ред бунарчића пипетом одмјерити стандардну запремину ресуспендованог талога и сваког разријеђења (15 µl је довољно за бунарчиће пречника 6 mm - повећати запремину за веће). Други ред може се користити као дупликат првог или за други узорак као што је приказано на Шеми 5.

4.2. Оставити да се капице осуше на собној температури или их загријати до температуре од 40 °C до 45 °C. Њелије бактерија фиксирати на IF плочицу загријавањем (15 минута на 60 °C), провлачењем кроз пламен, 95% етанолом или према посебним упутствима произвођача антигенијела.

Уколико је то неопходно, фиксиране плочице могу се чувати замрзнуте у десикатору у краћем временском интервалу (највише до три мјесеца).

Припрема плочица у складу са т. 4.1. а) и 4.3. а)
Разријеђење ресуспендованог талога
1/100 1/1 1/1 1/1 1/1 □ разријеђење ресуспендованог талога
(Т - титар) Т2 Т4 Т2 Т 2Т □ двоструко разријеђење серума/антигенијела

Узорак 1	●	●	●	●	●
Дупликат узорка 1 или узорак 2	●	●	●	●	●
	1	2	3	4	5
	6	7	8	9	10

Шема 4.

4.3. IF поступак:

а) у складу са поступком за припрему плочица за тестирање, како је описано у 4.1. а), припремити двоструки низ разријеђења антигенијела у IF пуферу. Први бунарчић мора имати 1/2 титра (Т/2), а остали 1/4 титра (Т/4), 1/2 титра (Т/2), титар (Т) и двоструки титар (2Т);

б) у складу са поступком за припрему плочица за тестирање, како је описано у 4.1. б), припремити радно разријеђење антигенијела у IF пуферу. Радно разријеђење учите на специфичност.

Припрема плочица у складу са т. 4.1. б) и 4.3. б)
Радна разријеђења серума/антигенијела
1/1 1/10 1/100 празно празно □ децимална разријеђења ресуспендованог талога

Узорак 1	●	●	●	●	●
Дупликат узорка 1 или узорак 2	●	●	●	●	●
	1	2	3	4	5
	6	7	8	9	10

Шема 5.

4.3.1. Поређати плочице на навлажени папир. Сваки бунарчић потпуно испунити разријеђењем антигенијела. Запремина антигенијела мора бити једнака запремини нанесеног екстракта.

Уколико не постоје посебна упутства произвођача антигенијела, потребно је слиједити следећу процедуру.

4.3.2. Инкубирати прекривене плочице на влажном папиру 30 минута на собној температури (од 18 °C до 25 °C).

Капице са сваке плочице отрести и плочице пажљиво испрати IF пуфером. Потопити плочице у IF пуфер Tween (Поглавље V овог прилога) па у IF пуфер, у трајању од по пет минута. Спријечити стварање аеросола или пренос капица, јер би могло доћи до унакрсне контаминације узорка. Плочице пажљиво осушити упијајућим папиром.

4.3.3. Поређати плочице на навлажени упијајући папир. Бунарчиће попунити разријеђеним FITC конјугатом који се користи

за одређивање титра. Запремина конјугата нанесеног на бунарчић мора бити једнака запремини нанесеног антигенијела.

4.3.4. Инкубирати покривене плочице на влажном папиру, 30 минута на собној температури (од 18 °C до 25 °C).

4.3.5. Отрести капице конјугата са плочица. Испрати и опрати плочице како је претходно описано (4.3.3). Плочице пажљиво осушити.

4.3.6. На сваки бунарчић пипетом нанијети од 5 µl до 10 µl 0,1 М глицерола са фосфатним пуфером (Поглавље V овог прилога) или комерцијално доступно средство против избљеђивања и ставити покривно стакло.

4.4. Очитавање IF теста

4.4.1. Прегледати припремљене плочице под епифлуоресцентним микроскопом са одговарајућим филтерима за екситацију FITC, под уљном или воденом имерзијом и увећањем од 500 до 1.000 пута.

Прегледати сваки бунарчић уздуж и попречно, под правим углом и дуж спољне ивице. За узорке у којима је видљив мали број ћелија или их уопште нема прегледати најмање 40 микроскопских видних поља.

Прво треба прегледати плочицу са позитивном контролом.

Ћелије морају бити изразито флуоресцентне и потпуно обојене на утврђеном титру антигенијела или радног разријеђења. У случају да код обојености дође до одступања, IF тест се мора поновити.

4.4.2. Утврдити да ли јасно флуоресцентне ћелије које се уочавају у бунарчићима имају морфологију карактеристичну за *C. m. subsp. sepedonicus*.

Интензитет флуоресценције мора бити једнак или бољи од оног који даје позитивни контролни изолат при једнаком разријеђењу антигенијела. Занемарити непотпуно обојене или слабо флуоресцентне ћелије.

Уколико се посумња на контаминацију, тест се мора поновити - нпр. ако због контаминације пуфера све плочице у серији показују позитивне ћелије или ако су позитивне ћелије пронађене (изван бунарчића) на површини плочице.

4.4.3. Постоји неколико проблема у вези са специфичношћу теста имунофлуоресценције. У концентрованом екстракту издвојених конуса пупчаних дијелова кртоле или дијелова стабљике увијек се очекује и присуство популација флуоресцентних ћелија са нетипичном морфологијом или унакрсна реакција са сапрофитним бактеријама сличне величине и грађе као *C. m. subsp. sepedonicus*.

4.4.4. Приликом очитавања у обзир се узимају само флуоресцентне ћелије типичне величине и морфологије у титру или радном разријеђењу антигенијела како је описано у тачки 4. подтачка 4.3. овог поглавља.

4.4.5. Тумачење очитавања IF теста:

а) уколико се утврди присуство јасно флуоресцентних ћелија карактеристичне морфологије, одредити просјечан број типичних ћелија по микроскопском видном пољу и израчунати број типичних ћелија по ml ресуспендованог талога (Поглавље VI овог прилога). Очитавање IF теста је позитивно за узорке који имају најмање 5 · 10³ типичних ћелија по ml ресуспендованог талога. Овакав узорак сматра се потенцијално контаминираним и потребно је извршити даље тестирање;

б) очитавање IF теста је негативно за узорке који имају мање од 5 · 10³ ћелија по ml ресуспендованог талога и узорак се сматра негативним. Није потребно даље тестирање.

5. FISH тест

Начело: Уколико се у FISH тесту као првом тесту провере добије позитиван резултат, IF тест се користи као други обавезни тест провере. Ако се FISH тест користи као други тест провере и ако се њиме добије позитиван резултат, за постављање коначне дијагнозе треба обавити даље тестирање према дијаграму тока.

Напомена

Користити потврђене и одобрене олиго-пробе специфичне за бактерију *C. m. subsp. sepedonicus* (Поглавље IX овог прилога). Прелиминарна тестирања примјеном ове методе треба да омогуће поновљиву детекцију најмање 10³ до 10⁴ ћелија *C. m. subsp. sepedonicus* по ml додатих екстракту узорка претходно доказаног као негативног.

Поступак треба извршити на свјеже припремљеним екстрактима узорка, али се успјешно може примјењити и на екстракт узорка који је био чуван са глицеролом на температури од -16 °C до -24 °C или од -68 °C до -86 °C.

За негативну контролу употребити дијелове екстракта узорка који су у ранијем тестирању на *C. m. subsp. sepedonicus* доказани као негативни.

За позитивну контролу припремити суспензије које садрже 10^5 до 10^6 ћелија/ml 0,01M фосфатног пуфера (PB) *C. m. subsp. sepe-donicus* (нпр. сој NCPPB 4053 или PD 406) из културе старе три до пет дана (за припрему видјети Поглавље IV овог прилога). Припремити одвојене плочице за позитивну контролу са хомологим или неким другим референтним изолатом *C. m. subsp. sepe-donicus*, раствореним у екстракту кромпира као што је наведено у Поглављу IV овог прилога.

Коришћење еубактеријске олиго-пробе обиљежене FITC омогућава контролу процеса хибридизације, јер ће се објекти све еубактерије присутне у узорку.

Контролни материјал тестирати примјеном исте процедуре као и узорке.

5.1. Фиксирање екстракта кромпира

Сљедећи протокол се заснива на процедури Wullings и сар, (1998):

5.1.1. Припремити раствор за фиксирање (Поглавље IX овог прилога).

5.1.3. Пипетом одмјерити 100 μ l екстракта сваког узорка у Eppendorf епрувету, па центрифугирати осам минута на 7.000 g.

5.1.4. Уклонити супернатант и растворити талог у 500 μ l фиксатива припремљеног највише 24 часа раније, промијешати и инкубирати преко ноћи на 4 °C. Алтернативни фиксатив је 96% етанол. При томе је потребно растворити талог у 50 μ l 0,01 M PB и 50 μ l 96% етанола, промијешати и инкубирати на 4 °C 30 до 60 минута.

5.1.5. Центрифугирати осам минута на 7.000 g, уклонити супернатант и ресуспендовати талог у 75 μ l 0,01 M PB (Поглавље V овог прилога).

5.1.6. У бунарчиће чистих плочица нанијети 16 μ l фиксираних суспензија како је приказано на Шеми 6. На сваку плочицу нанијети два различита, неразријеђена узорка и употреједити 10 μ l за припремање разријеђења 1 : 100 (у 0,01 M PB). Преостали фиксирани раствор узорка (49 μ l) чувати на -20 °C после додавања једнаке запремине 96% етанола. Ако FISH тест треба поновити, центрифугирањем уклонити етанол и додати једнаку запремину 0,01 PB (уз мијешање).

Приказ плочице за FISH тест

Шема 6.

Узорак 1	Празно	Празно	Празно	Узорак 2
О	О	О	О	О
Бунарчић 1	Бунарчић 2	Бунарчић 3	Бунарчић 4	Бунарчић 5
Узорак 1	Празно	Празно	Празно	Узорак 2
О	О	О	О	О
Бунарчић 6	Бунарчић 7	Бунарчић 8	Бунарчић 9	Бунарчић 10
Покровна плочица 1			Покровна плочица 2	

5.1.6. Плочице осушити на ваздуху (или у сушици на 37 °C) па их фиксирати провлачењем кроз пламен. На овом кораку се може прекинути поступак и наставити сљедећи дан. Плочице треба чувати на собној температури у сувом простору без прашине.

5.2. Претхибридизација и хибридизација

5.2.1. Припремити раствор лизозима који садржи 10 mg лизозима (Sigma L-6876) у 10 ml пуфера (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8,0). Тај се раствор може чувати, али се само једном смије замрзнути и одмрзнати. Сваки узорак добро прекрити са приближно 50 μ l раствора лизозима и инкубирати десет минута на собној температури. Затим са само једном потопити плочицу у деминерализовану воду и пажљиво осушити филтер-папиром.

Алтернативно, умјесто лизозима додати 50 μ l 40 до 400 μ g ml⁻¹ протеиназе К у пуферу (20 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl₂, pH 7,4) на сваки бунарчић и инкубирати на 37 °C 30 минута.

5.2.2. Дехидратацију ћелија извршити узастопним потапањем плочица у 50%, 80% и 90% етанол, у трајању од по једног минута. Плочице поставити на држач и осушити на ваздуху.

5.2.3. Припремити влажну комору за инкубацију тако што се дно херметички затворене кутије прекрива упијајућим или филтер-папиром потопљеним у 1 : hybmix (Поглавље IX овог прилога).

Кутију претходно инкубирати у апарату за хибридизацију нуклеинских киселина на 55 °C најмање десет минута.

5.2.4. Припремити раствор за хибридизацију, и то 45 μ l по плочици (Поглавље IX овог прилога) и претходно инкубирати пет минута на 55 °C.

5.2.5. Ставити плочице на термоблок на 45 °C и нанијети по 10 μ l хибридизованог раствора на сваки од четири бунарчића.

5.2.6. Ставити два покривна стакалица (24 mm $\times$ 24 mm) на сваку плочицу, пазећи притом да у бунарчићима не остане ваздух. Ставити плочицу у претходно загријану влажну комору и хибридизовати у апарату за хибридизацију на 55 °C, у мраку (преко ноћи).

5.2.7. Припремити три посуде са 1 l ултрачисте воде, 1 l 1 : hybmix (334 ml 3 : hybmix и 666 ml ултрачисте воде) и 1 l 1/2 : hybmix (167 ml 3 : hybmix и 833 ml ултрачисте воде). Сваку посуду претходно инкубирати у воденом купатилу на 55 °C.

5.2.8. Скинути покривна стакалица, а предметне плочице ставити на држач.

5.2.9. Вишак пробе уклонити инкубирањем у трајању од 15 минута на 55 °C у посуди са 1 : hybmix.

5.2.10. Пренијети држач плочица у раствор за прање (1/2 hybmix) и инкубирати још 15 минута.

5.2.11. Плочице накратко уронити у ултрачисту воду и ставити на филтер-папир. Вишак влаге уклонити филтер-папиром. У сваки бунарчић пипетом нанијети од 5 μ l до 10 μ l заштитног раствора против избљешивања (нпр. Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA или еквивалентна), па цијелу предметну плочицу покрити великим покривним стаклом (24 mm $\times$ 60 mm).

5.3. Очитавање FISH теста

5.3.1. Плочице прегледати под епифлуоресцентним микроскопом, коришћењем уљане имерзије, с увећањем 630 или 1.000 пута. Са филтером прикладним за флуоресцеин-изотиоцијанат (FITC) еубактеријске ћелије (укључујући већину Грам-негативних ћелија) у узорку се виде као флуоресцентно зелене. Употребом филтера за тетраметилродамин-5-изотиоцијанат ћелије *C. m. subsp. sepe-donicus*, обојене са Cu3, виде се као флуоресцентно црвене. Упоредити морфологију ћелија узорка с морфологијом ћелија позитивних контрола. Ћелије морају бити јасно флуоресцентне и у потпуности обојене. Ако дође до одступања у обојености, FISH тест се мора поновити. Прегледати сваки бунарчић уздуж и попријекло под нормалним углом и дуж спољне ивице. За узорке у којима је видљив мали број ћелија или их уопште нема прегледати најмање 40 микроскопских видних поља.

5.3.2. Уочити да ли су видљиве јасно флуоресцентне ћелије у бунарчићима морфологије карактеристичне за *C. m. subsp. sepe-donicus* (види веб-страницу).

Интензитет флуоресценције мора бити једнак или јачи него код позитивне контроле. Ћелије које нису у потпуности обојене или су слабе флуоресценције не узимају се у обзир.

5.3.3. Уколико постоји сумња да је дошло до контаминације, тест се мора поновити (нпр. све плочице у серији због контаминације пуфера показују позитивне ћелије или су позитивне ћелије пронађене изван бунарчића, на површини плочице).

5.3.4. Постоји неколико проблема у вези са специфичношћу FISH теста. У концентрованом екстракту издвојених конуса пупчаних дијелова кроле или стабилке увијек се очекује и присуство популација флуоресцентних ћелија са нетипичном морфологијом или унакрсна реакција са сапрофитним бактеријама сличне величине и грађе као *C. m. subsp. sepe-donicus*, мада знатно ријеђе него код IF теста.

5.3.5. У обзир се узимају само флуоресцентне ћелије типичне величине и морфологије.

5.3.6. Тумачење резултата FISH теста:

а) резултати FISH теста сматрају се важећим ако се у свим позитивним и ни у једној негативној контроли примјеном FISH филтера уочава присуство јасно зелених флуоресцентних ћелија чија је величина и морфологија типична за *C. m. subsp. sepe-donicus* и ако се примјеном филтера за родамин уочавају јасне црвене флуоресцентне ћелије. Ако се уоче јасне ћелије карактеристичне морфологије, одредити просјечан број типичних флуоресцентних ћелија по микроскопском видном пољу и израчунати број типичних ћелија по ml ресуспендованог талога (Поглавље VI овог прилога). Потенцијално позитивним сматрају се узорци са најмање $5 \cdot 10^3$ типичних ћелија по ml ресуспендованог талога и потребна су им даља тестирања. Негативним се сматрају узорци с мање од $5 \cdot 10^3$ типичних ћелија по ml ресуспендованог талога.

б) FISH тест је негативан ако се примјеном филтера за родамин не уоче снажно флуоресцентне црвене ћелије чија је величина и морфологија типична за *C. m. subsp. sepe-donicus*, под условом да се примјеном филтера за родамин уоче типичне изразито флуоресцентне црвене ћелије у препаратима позитивне контроле.

6. PCR тест

Начело: Када се употребом PCR теста као првог теста провјере добије позитиван резултат, IF тест се користи као други обавезни тест провјере. Ако се коришћењем PCR теста као другог теста про-

дјерге добије позитиван резултат, за постављање коначне дијагнозе треба обавити даље тестирање према дијаграму тока.

Коришћење ове методе као главног теста провјере препоручује се само уколико је доступна специјализована експертиза.

Напомена

ПРЕЛИМИНАРНА ТЕСТИРАЊА примјеном ове методе треба да омогуће поновљиву детекцију најмање 10^3 до 10^4 ћелија *S. m. subsp. sepedonicus* по ml који су додате екстракту узорка претходно доказаног као негативног.

За постизање највећег степена осјетљивости и специфичности у свим лабораторијама, потребно је извођење огледа за стандардизацију (оптимизацију) методе. Користити потврђене и одобрене реагенси и протоколе за PCR. Пожељно је одабрати метод који подлијеже интерној контроли. Предузети одговарајуће мјере опреза да би се избјегла контаминација узорка циљном ДНК. PCR тест треба да обављају искусни стручњаци, у специјализованим лабораторијама за молекуларну биологију.

Негативне контроле (за екстракцију ДНК и PCR поступак) треба да се увијек у поступку обраде посљедње како би се утврдило да ли је евентуално дошло до било каквог преношења ДНК.

У PCR тест укључити сљедеће негативне контроле:

1. екстракт узорка у коме претходно током тестирања није доказано присуство *S. m. subsp. sepedonicus*;

2. пуфер коришћен за екстракцију бактерије и ДНК из узорка;

3. PCR реакциони микс.

У PCR тест укључити сљедеће позитивне контроле:

- аликвоте ресуспендованих талога у које је додата *S. m. subsp. sepedonicus* (Поглавље IV овог прилога),

- суспензију од 10^6 ћелија по ml вирулентног изолат *S. m. subsp. sepedonicus* у води (нпр. NCPPB 2140 или NCPPB 4053);

4. ако је могуће, у PCR тесту користити и ДНК екстрахован из позитивних контролних узорка.

Да би се избјегла могућа контаминација, позитивне контроле припремити просторно одвојено од узорка за тестирање.

С обзиром на то да примјена PCR протокола захтијева коришћење екстракта узорка са што мање земље, прије почетка процедуре извођења теста узорке кромпира је пожељно добро опрати.

6.1. Методе пречишћавања ДНК

Позитивну и негативну контролу користити на претходно описан начин. Контролни материјал припремити на исти начин као и узорке.

Доступне су различите методе пречишћавања циљане ДНК из комплексних супстрата узорка с циљем уклањања инхибитора PCR реакције и других ензимских реакција и методе концентровања циљане ДНК у екстракту узорка.

Метода која сlijеди је стандардизована за коришћење са потврђеном и одобреном PCR методом у (Поглавље VIII овог прилога).

а) Метода према Pastriku (2000)

1. Пипетом одмјерити 220 μ l лизис пуфера [100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)] у Eppendorf тубу од 1,5 ml;

2. Додати 100 μ l екстракта узорка и ставити у термоблок или водено купатило на 95 °C 10 минута;

3. Ставити тубу на лед у трајању од пет минута;

4. Додати 80 μ l основног шток раствора Lysozyme (50 mg лизозима по ml у 10 mM Tris HCl, pH 8,0) и инкубирати на 37 °C 30 минута;

5. Додати 220 μ l раствора Easy DNA® A (Invitrogen), добро измјешати на вортексу и инкубирати на 65 °C 30 минута;

6. Додати 100 μ l раствора Easy DNA® A (Invitrogen) и снажно измјешати на вортексу до постизања униформног вискозитета узорка;

7. Додати 500 μ l хлороформа, измјешати на вортексу док се вискозитет не умањи и смјеса постане хомогена;

8. Центрифугирати на 15.000 g 20 минута на 4 °C да се подијеле фазе и створи међуфаза;

9. Пренијети горњу фазу у нову Eppendorf тубу;

10. Додати 1 ml 100% етанола (-20 °C), кратко промјешати на вортексу и инкубирати на леду 10 минута;

11. Центрифугирати на 15.000 g 20 минута на 4 °C и уклонити етанол од талога;

12. Додати 500 μ l 80% етанола (-20 °C) и промјешати окретањем тубе;

13. Центрифугирати на 15.000 g 10 минута на 4 °C, сачувати талог а уклонити етанол;

14. Оставити талог да се суши на ваздуху или у вакуумској центрифуги (DNK speed vac);

15. Ресуспендовати талог у 100 μ l стерилне ултрачисте воде и оставити на собној температури најмање 20 минута;

16. Чувати на -20 °C до извођења PCR;

17. Било који бијели талог издвојити центрифугирањем и за PCR употребити 5 μ l супернатанта који садржи ДНК;

б) Друге методе

За екстракцију ДНК могу се примјенити и друге методе (нпр. Qiagen DNeasy Plant Kit) уколико је доказана еквивалентност у прочишћавању ДНК из контролних узорка који садрже 10^3 до 10^4 патогених ћелија по ml.

6.2. PCR

6.2.1. Припремити узорке за тестирање и контролне узорке за PCR према одобреним протоколима (Поглавље VIII овог прилога). Припремити разрјеђење екстракта ДНК из узорка 1 : 10 у ултрачистој води.

6.2.2. У неконтаминираном простору припремити одговарајући реакциони микс за PCR према објављеним протоколима (Поглавље VIII овог прилога). Одобрени PCR протокол је мултиплекс реакција која такође укључује унутрашњу PCR контролу.

6.2.3. Додати 5 μ l екстракта ДНК у стерилне епрувете за PCR за PCR реакцију која се изводи у 25 μ l.

6.2.4. Укључити и негативну контролу која садржи само PCR реакциони микс, а умјесто узорка додати исти извор ултрачисте воде који је коришћен за припрему PCR реакционог микса.

6.2.5. Ставити епрувете у уређај за PCR (thermal cycler) и покренути стандардизовани PCR програм (Поглавље VIII овог прилога).

6.3. Анализа PCR производа

6.3.1. Умножене PCR продукте раздвојити електрофорезом у агарозном гелу. У сваки бунарчић 2% (v/v) агарозног гела у трис-ацетат EDTA пуферу (ТАЕ) нанјети најмање 12 μ l ампликона ДНК из сваког узорка, помијешане с 3 μ l боје и пропустити уз напон од 5 до 8 В V/cm. Употријебити одговарајући ДНК маркер, нпр. 100 bp ladder (Поглавље VIII овог прилога).

6.3.2. Обојити електрофоретске траке ДНК у гелу потапањем гела у етидијум бромид (0,5 mg/l) у трајању од 30 до 45 минута. Предузети одговарајуће мјере опреза при раду са овим мутагеном.

6.3.3. Обојени гел прегледати на краткоталасном UV транслуминатору (нпр. $\lambda = 302$ nm) и потражити умножене фрагменте очекиване дужине (Поглавље VIII овог прилога) и документовати их.

6.3.4. Приликом сваког новог налаза/случаја провјерити аутентичност умноженог PCR продукта извођењем анализе уз помоћ рестрикционих ензима на узорку преостале умножене ДНК, и то инкубацијом при оптималној температури и у оптималном времену с одговарајућим ензимом и пуфером (Поглавље VIII овог прилога). Настале фрагменте раздвојити електрофорезом у агарозном гелу како је претходно наведено и посliје бојења етидијум бромидом на UV транслуминатору посматрати карактеристичну матрицу (образец) рестрикционих фрагмената и упоредити је са позитивном контролом прије и посliје раздвајања.

Тумачење резултата PCR теста

PCR тест је негативан ако у тестираном узорку није видљив PCR продукт очекиване дужине, који је специфичан за *S. m. subsp. sepedonicus*, али је видљив у свим позитивним контролним узорцима (код мултиплекса PCR са прајмерима за унутрашњу контролу који су специфични за биљку домаћина: у тестираном узорку се мора умножити други продукт PCR очекиване величине).

PCR тест је позитиван ако је видљив PCR продукт који је специфичан за *S. m. subsp. sepedonicus* и који је очекиване дужине и рестрикционог обрасца, под условом да није умножен ни у једном узорку који представља негативну контролу. Поуздана потврда позитивног резултата представља и успјешно понављање теста с другим паром PCR прајмера (тачка 9. подтачка 9.3. овог поглавља).

Напомена

Уколико се очекивани фрагмент (позитивна реакција) добије у узорку позитивне контроле која садржи *S. m. subsp. sepedonicus* у води, а негативни резултат добије у узорку позитивне контроле која садржи *S. m. subsp. sepedonicus* у екстракту кромпира, претпоставља се да је дошло до инхибиције PCR реакције. У мултиплекс PCR протоколима који се изводе употребом унутрашњих PCR контрола сматра се да је дошло до инхибиције реакције ако није добијен ни један од два продукта.

Такође, ако се из једне или више негативних контрола добије очекивани продукт, може се сумњати да је дошло до контаминације.

Напомена

ПРЕЛИМИНАРНО ТЕСТИРАЊЕ ОВОМ МЕТОДОМ ТРЕБА ДА ОМОГУЋИ ПОНОВЉИВО ОТКРИВАЊЕ ПРИСУСТВА 10^3 ДО 10^4 CFU C. m. subsp. *sepedonicus* PO ml, ДОДАТКИХ ЕКСТРАКТИМА УЗОРАКА КОЈИ СУ У РАНИЈЕМ ТЕСТИРАЊУ БИЛИ НЕГАТИВНИ (ЗА ПРИПРЕМУ ВИДЈЕТИ ПОГЛАВЉЕ IV ОВОГ ПРИЛОГА).

НАЈВЕЋА ОСЈЕТЉИВОСТ ДЕТЕКЦИЈЕ МОЖЕ СЕ ОЧЕКИВАТИ АКО СЕ КОРИСТЕ СВЈЕЖЕ ПРИПРЕМЉЕНИ ЕКСТРАКТИ УЗОРАКА И ОПТИМАЛНИ УСЛОВИ ЗА РАСТ И РАЗВОЈ ПАТОГЕНА. МЕЋУТИМ, ОВА МЕТОДА МОЖЕ УСПЈЕШНО ДА СЕ ПРИМЕНИ И УПОТРЕБОМ ЕКСТРАКТА КОЈИ СУ ЧУВАНИ СА ГЛИЦЕРОЛОМ НА ТЕМПЕРАТУРИ ОД -68°C ДО -86°C .

НЕКЕ СОРТЕ ПЛАВОГ ПАТЛИЦИАНА ПРЕДСТАВЉАЈУ ОДЛИЧНУ СЕЛЕКТИВНУ ПОДЛОГУ ЗА ОБОГАЊЕЊЕ И РАСТ C. m. subsp. *sepedonicus*, ЧАК И У ОДСУСТВУ СИМПТОМА, А УЈЕДНО СУ И ОДЛИЧНЕ ЗА УТВРЂИВАЊЕ БИЉАКА ДОМАЋИНА. УСЛОВИ РАСТА ТРЕБА ДА СУ ОПТИМАЛНИ ДА БИ СЕ УМАЊИО РИЗИК ОД ДОБИЈАЊА ЛАЖНО НЕГАТИВНИХ РЕЗУЛТАТА.

ДЕТАЉИ У ВЕЗИ СА ГАЈЕЊЕМ БИЉАКА (ПОГЛАВЉЕ X ОВОГ ПРИЛОГА).

7.1. На преосталу количину ресуспендованог талога остављеног за тестирање из 3.1.6. или 3.2.5. примјењити методу инокулације зарезивањем или методом инокулације инјекцијом. Користити само биљке плавог патлициана у стадијуму два до три права листа, до потпуне развијености трећег правог листа. По једном узорку потребно је 15 до 25 биљака патлициана да би се у потпуности искористило ресуспендовани талог и осигурала ефикасна инокулација.

7.2. С циљем смањења тургора, биљке патлициана не залијевати један до два дана прије инокулације.

7.3. Инокулација зарезивањем:

7.3.1. Држећи биљку међу прстима, пипетом нанијети капљицу (око 5-10 μl) ресуспендованог талога на стабљику, и то између котиледона и првог листа;

7.3.2. Стерилним скалпелом направити дијагонални рез, дуг око 1 cm и дубок око 2/3 дебљине стабљике, почевши од нанесене капљице ресуспендованог талога;

7.3.3. Чврсто затворити рез стерилним вазелином из шприца.

7.4. Инокулација инјекцијом.

Стабљике плавог патлициана инокулисати непосредно изнад котиледона инјекцијом с танком иглом (не мањом од 23 G). Узорак подијелити на биљке плавог патлициана тако да свака биљка добије одговарајућу количину.

7.5. Позитивна контрола: пет биљака инокулисати суспензијом од 10^3 до 10^6 ћелија по ml воде познате културе C. m. subsp. *sepedonicus* и, када је могуће, екстрактом природно зараженог ткива кртола (тачка 4. овог поглавља) истом методом инокулације.

7.6. Негативна контрола: пет биљака инокулисати истом методом инокулације користећи стерилни пелет пуффер (пуффер за раставање талога).

Биљке гајити у карантинским просторијама до четири седмице на 18°C до 24°C , уз довољну количину свјетла и високу влажност (од 70% до 80%) и адекватно залијевају како би се спрјечило накупљање воде или увенуће због недостатка воде. C. m. subsp. *sepedonicus* се не развија на температурама изнад 30°C , а оптимална температура је 21°C .

7.7. С циљем спречавања унакрсне контаминације, биљке позитивне и негативне контроле гајити најјасно одвојеним столовима у стакленику или полицима у комори за раст или, у случају да је простор ограничен, побринути се да су биљке јасно одвојене између појединих поступака у току извођења процедуре. Ако се биљке за различите узорке морају гајити близу једна другој, раздвојите их погодним платном. Пазити да не дође до унакрсне контаминације приликом прихрањивања, залијевања, прегледања и сваког другог поступка с биљкама. Од кључне важности је да у стакленицима и коморама за гајење не буде никаквих инсеката јер они могу пренијети бактерију с узорка на узорак.

7.8. Појаву симптома редовно провјеравати послје седам дана од инокулације. Пребројати биљке које показују симптоме. C. m. subsp. *sepedonicus* изазива увенуће листова патлициана које може почети као увенулош ивица или између нерава листова. Увенуло ткиво у почетку изгледа тамнозелено или проширано, али касније постаје бјелијед па некротично. Увела површина између лисних нерава често изгледа масно, као да је натопљена водом. Некротично ткиво често има свијетложућу ивицу. Биљке не угину увijek, што је период прије него што се симптоми почну развијати дужи, већа је могућност преживљавања. Биљке могу прерастати заразу. Младе биљке патлициана много су осјетљивије на присуство ниског нивоа популација C. m. subsp. *sepedonicus* него старије биљке; због тога се користе биљке у фази три права листа или непосредно прије фазе три права листа.

Увенуће може бити изазвано и популацијом других бактерија или гљивица које су присутне у екстракту ткива кртола. То

су: *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* и *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, *Erwinia chrysanthemi*, *Phoma exigua* var. *foveata*, као и популације великог броја сапрофитних бактерија. Нарочито *Erwinia chrysanthemi* може изазвати симптоме на листовима и увенуће које је врло слично симптомима C. m. subsp. *sepedonicus*. Једину разлику представља појава тамњена/црњења стабљика у случају инфекција бактеријом *Erwinia chrysanthemi*. Друге врсте увенућа се разликују од оних које проузрокује C. m. subsp. *sepedonicus*, зато што цијели листови или цијеле биљке врло брзо вену. C. m. subsp. *sepedonicus* се од *Erwinia* spp. може брзо и лако раздвојити и извођењем бојења и/или реакције по Граму.

7.9. Одамо по уочавању присуства симптома на биљкама патлициана потребно је извршити реизолацију, користећи дијелове увенулог ткива лишаја или ткива стабљике. Листове и стабљике биљака патлициана површински дезинфиковати брисањем са 70% етанолом. Ткиво измацерирати и примјењити IF или PCR тест на соку патлициана и изолацију патогена на погодну (селективну) хранљиву подлогу (тачка 8. овог поглавља). Такође, може се примјењити и бојење/реакција по Граму (Поглавље XI овог прилога). Извршити идентификацију чисте културе C. m. subsp. *sepedonicus* и провјеру патогености (т. 9. и 10. овог поглавља).

7.10. У одређеним околностима, нарочито у условима неповољним за раст и развој биљака, могуће је да се чак и послје периода инкубације од четири недеље C. m. subsp. *sepedonicus* налази латентно у биљкама патлициана. Ако ни послје четири недеље од инокулације не дође до појаве симптома, на биљкама треба извести IF/PCR тест на збирном узорку састављеном од дијелова стабљике (1 cm од сваке биљке за тестирање, узетом изнад мјеста инокулације). Ако је тест позитиван, поновно извршити изолацију патогена на одговарајућу (селективну) хранљиву подлогу, према поступку из тачке 8. овог прилога. Извршити идентификацију чисте културе C. m. subsp. *sepedonicus* и провјеру патогености (т. 9. и 10. овог поглавља).

Тумачење резултата биолошког теста - валидни резултати биолошког теста добијају се ако биљке у позитивној контроли показују типичне симптоме, ако се из тих биљака може поново издвојити бактерија и ако на биљкама негативне контроле не дође до појаве симптома.

Биолошки тест је негативан ако тестиране биљке нису заражене C. m. subsp. *sepedonicus*, а под условом да је утврђено присуство C. m. subsp. *sepedonicus* у позитивним контролама.

Биолошки тест је позитиван ако су тестиране биљке заражене C. m. subsp. *sepedonicus*.

8. ИЗОЛАЦИЈА C. m. subsp. *sepedonicus*

Напомена

Дијагноза се може потврдити само ако се C. m. subsp. *sepedonicus* изолује, а затим изврши и идентификација добијеног изолата (тачка 9. овог поглавља) и ако се потом потврди и патогеност добијеног изолата (тачка 10. овог поглавља). Иако је C. m. subsp. *sepedonicus* захтијевао организам, може се изоловати из ткива са карактеристичним симптомима. Приликом изолације лако може доћи до прерастања колонije овог патогена са колонијама брзорастућих сапрофитних бактерија, па је зато изолација директно из екстракта ткива кртола или стабљике тешка. Директна изолација C. m. subsp. *sepedonicus* могућа је коришћењем одговарајуће селективне хранљиве подлоге и разријеђања ресуспендованог талога добијеног из издвојеног конуса пупчаног дијела кртоле или из стабљика кромпира.

Изолација је потребно извршити из свих кртола или дијелова стабљике кромпира са симптомима, као и из тестираних биљака патлициана код којих нису примјењени симптоми или је IF/PCR тест из збирног узорка био позитиван (тачка 7. подтачка 7.10). По потреби, треба да се користи и мацерирање стабљика патлициана према прописаној процедури.

Позитивна контрола: припремити децимална разријеђања суспензије 10^6 CFU по ml C. m. subsp. *sepedonicus* (нпр. NCPPB 4053 или PD 406). Позитивне контроле припремити потпуно одвојено од узорака који се тестирају да би се избјегла могућност контаминарања узорака.

Прије у употребе за рутинско тестирање узорака провјерити погодност сваке серије селективне хранљиве подлоге за раст и развој патогена. Контролни материјал подвргнути истим принципима тестирања, као и узорак или узорке.

8.1. Гајење на селективној хранљивој подлози

8.1.1. Из одвојене количине од 100 μl ресуспендованог талога добијеног из кртоле кромпира или биљног сока биљака патлициана припремити децимална разријеђања у пелет пуфери (пуффер за раставање талога из тачке 3. овог поглавља).

8.1.2. Изолација из ресуспендованог талога без претходног разријеђивања обично не успијева због тешког гајења C. m. subsp. *sepedonicus* и велике конкурентске способности сапрофита. C

обзиром на то да је у зараженом ткиви биљке бактерија обично присутна у популацијама високог нивоа, сапрофити се могу одстранити разријеђивањем, док патоген остане. Стога се препоручује наношење 100 µl из сваког узорка (код употребе Петријевих посуда пречника 90 mm, док за Петријеве посуде других величина треба прилагодити количину), 1/100 до 1/10.000 разријеђене суспензије на хранљиву подлогу MTNA или на NCP-88 (Поглавље VII овог прилога), техником размаза.

Напомена

Алтернативна могућност је размаз почетне количине од 100 µl ресуспендованог талога на прву подлогу, а затим прављење размаза истим штапићем на другој и трећој подлози, при чему се на њих наносе остаци екстракта с претходне подлоге. На овај начин добија се ефекат сличан ефекту коришћења разријеђења.

8.1.3. Засијану подлогу инкубирати у мраку на температури од 21 °C до 23 °C.

8.1.4. Прва провјера подлога и процјена појаве и развоја колонија налик *C. m. subsp. sepedonicus* у поређењу са подлогама позитивне контроле врши се послје три дана, а наредне процјене послје пет, седам и евентуално десет дана.

8.2. Пречишћавање сумњивих колонија

Напомена

Колоније сличне *C. m. subsp. sepedonicus* треба даље пренијети на хранљиву подлогу YGM ако ће се користити за инокулацију патлициана и/или даљу идентификацију. То треба учинити прије него на подлогама док не прерастања колонија, односно најбоље послје три до пет дана.

8.2.1. Размазом нанијети колоније сличне *C. m. subsp. sepedonicus* на једну од следећих хранљивих подлога: хранљиви агар с додатком декстрозе (користи се само за пресијавање изолат), агар са додатком квасца, пептона и глукозе, агар са додатком екстракта квасца и минералних соли. Састав хранљивих подлога наведен је у Поглављу VII овог прилога.

Засијану подлогу инкубирати на 21 °C до 24 °C у трајању до 10 дана. *C. m. subsp. sepedonicus* споро расте, обично ствара кремaste, куполоaste колоније са шилањим врхом. Пречишћавање изолата постиже се поновним размазима и исцрпљивањем на одговарајућим хранљивим подлогама. Ниво пораста се повећава пресијавањем. Типичне колоније су кремастобијеле или боје слоноваче, понекад жуте, заокружене, глатке, повишене, конвексно-куполоaste, слузаво-течне, с цијелим ивицама и обично од 1 до 3 mm у пречнику. Једноставно бојење по Граму (Поглавље XI овог прилога) може помоћи при избору колонија за даље тестирање.

8.2.2. Извршити идентификацију изабраних колонија (тачка 9. овог поглавља) и провјерити патогеност изолата (тачка 10. овог поглавља).

9. Идентификација

Идентификација чисте културе добијених изолата *C. m. subsp. sepedonicus* врши се коришћењем најмање два теста од наведених тестова који се заснивају на различитим биолошким принципима. Према потреби, укључити познате референтне изолате за сваки тест.

9.1. Одгајивачки и ензимски тестови за идентификацију

Фенотипска својства универзално присутна или одсутна код бактерије *C. m. subsp. sepedonicus* утврдити према методама Elliott и Stead (1987), Klement и cap. (1990), Schaad и cap. (2001), непознати аутор (1987) и сл.

Све хранљиве подлоге инкубирати на 21 °C и прегледати након шест дана. Ако не дође до раста колонија, инкубирати до 20 дана. У све тестове треба укључити познату контролу *C. m. subsp. sepedonicus*. Одгајивачке и физиолошке тестове изводио коришћењем културе са хранљивог агара. Морфолошка упоређења извршити у односу на културу на хранљивом агару са додатком декстрозе.

Тестови	Очекивани резултати
Тест оксидације/ферментације (О/Ф)	инертан или слабо оксидативан
Активност оксидазе	-
Раст на 37 °C	-
Активност уреазе	-
Хидролиза ескулина	+
Хидролиза скроба	- или слаба
Толерантност на 7% раствора NaCl	-
Стварање индола	-
Активност каталазе	+

Стварање H ₂ S	-
Коришћење цитрата	-
Растварање желатина	-
Стварање киселине из глицерола	-
Стварање киселине из лактозе	- или слаба
Стварање киселине из рамнозе	-
Стварање киселине из салицина	-
Бојење по Граму (Поглавље XI)	+

9.2. IF тест

Припремити суспензију од приближно 10⁶ хелија по ml у IF пуферу (Поглавље V овог прилога).

Припремити двострука разријеђења раствора погодног антисепума.

Примијенити IF поступак (тачка 4. овог поглавља).

IF тест је позитиван ако је IF титар културе једнак титру позитивне контроле.

9.3. PCR тест

Припремити суспензију од приближно 10⁶ хелија по ml у ултрачистој води.

Загријати 100 µl суспензије хелија бактерије у затвореним епруветкама у термоблоку или у врелом воденом купатилу четири минута на 100 °C. Разлагање хелија, по потреби, може се убрзати додавањем свјеже припремљеног NaOH до коначне концентрације од 0,05 M. До употребе узорци се могу чувати на температури од -16 °C до -24 °C.

Употријебити одговарајуће PCR процедуре за умножавање специфичних фрагмената *C. m. subsp. sepedonicus* (нпр. Pastrik, 2000; видјети Поглавље VIII овог прилога; Li и de Boer, 1995; Mills и cap., 1997; Pastrik и Raineu, 1999; Schaad и cap., 1999).

Идентификација *C. m. subsp. sepedonicus* је позитивна ако су PCR продукти исте величине и имају исти полиморфизам дужине рестрикционих фрагмената, као и позитивни контролни изолат.

9.4. FISH тест

Припремити суспензију од приближно 10⁶ хелија по ml ултрачисте воде.

Примијенити FISH поступак (тачка 5. овог поглавља).

FISH тест је позитиван ако су постигнуте реакције културе и позитивне контроле једнаке.

9.5. Профилирање масних киселина (FAP)

Културу гајити на триптиказа-соја-агару (Oxoid) 72 часа на 21 °C (+/- 1 °C).

Примијенити одговарајући FAP поступак (Janse, 1991; Stead, 1992).

FAP тест је позитиван ако је профил тестиране културе идентичан профилу позитивне контроле. Присуство карактеристичних масних киселина: 15 : 1 Anteiso A, 15 : 0 Iso, 15 : 0 Anteiso, 16 : 0 Iso, 16 : 0 и 17 : 0 Anteiso у великој мјери указује да се ради о *C. m. subsp. sepedonicus*. Родови бактерија као *Curtobacterium*, *Arthrobacter* и *Micrococcus*, такође, имају неке од ових киселина, али 15 : 1 Anteiso A је киселина која се ријетко може пронаћи у овим бактеријама, али се појављује у свим бактеријама рода *Clavibacter*, и то између 1% до 5%. Код *C. m. subsp. sepedonicus* врједност је обично око 5%.

9.6. BOX-PCR

Припремити суспензију од приближно 10⁶ хелија по ml ултрачисте воде.

Примијенити тест у складу с процедуром (Smith и cap., 2001).

10. Тест потврде

Тест провјере патогености користи се за коначно потврђивање присуства *C. m. subsp. sepedonicus* и за процјену вирулентности култура идентификованих као *C. m. subsp. sepedonicus*.

10.1. Припремити инокулум од приближно 10⁶ хелија по ml из култура изолата који се тестира, старости три дана и одговарајућег изолата позитивне контроле *C. m. subsp. sepedonicus*.

10.2. Инокулисати стабљике пет до десет младих сијанаца плавог патлициана у фази три прва листа (тачка 7. подт. 7.3. или 7.4. овог поглавља).

10.3. Инокулисано сијанце инкубирати на температури од 18 °C до 24 °C, уз довољно количину свјетла и високу релативну влажност и адекватно залијевати како би се избјегло накупљање воде или стрес од суше (тачка 7. подтачка 7.7. овог поглавља). Код инокулације чистим културама типично увенуће појављује се у

року од двије недеље, док се биљке које не испољавају симптоме (видјети тачка 7. подтачка 7.8. овог поглавља) послеије тог време- на инкубирају још недељу дана на температурама повољним за раст плавог патлидана, али не вишим од 25 °C (Поглавље X овог прилога). Ако симптоми нису присутни ни послеије три недеље, добијена култура се не може потврдити као патогени изолат *C. m. subsp. sepedonicus*.

10.4. Изолацију из биљака са симптомима извршити одстрањивањем дијела стабљике дужине 2 cm изнад мјеста инокулације, који се потом уситни и раствори у малој количини стерилне дестиловане воде или 50 mM фосфатном пуферу (Поглавље V овог прилога). Изолација патогена потом се врши размазом добијеног мацерата на MTNA и YPGA подлоге (Поглавље VII овог прилога), инкубирањем три до пет дана на 21 °C до 23 °C и утврђивањем дали су формиране типичне колоније бактерије *C. m. subsp. sepedonicus*.

Поглавље III
ЛАБОРАТОРИЈЕ УКЉУЧЕНЕ У ОПТИМИЗАЦИЈУ И
ВАЛИДАЦИЈУ ПРОТОКОЛА

Лабораторија ¹ >	Мјесто	Држава
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Беч и Линц	Аустрија
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Белгија
Plantedirektoratet	Lingby	Данска
Central Science Laboratory	York	Енглеска
Scottish Agricultural Science Agency	Единбург	Шкотска
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	Француска
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terr	Le Rheu	Француска
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Њемачка
Pflanzenschutzamt Hannove	Хановер	Њемачка
State Laborator	Даблин	Ирска
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Холандија
Norwegian Crop Research Institute, Plant Protection Centre	Ас	Норвешка
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Лисабон	Португалија
Nacionalni institut za biologijo	Љубљана	Словенија
Centro de Diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	Шпанија

Поглавље IV
ПРИПРЕМА ПОЗИТИВНИХ И НЕГАТИВНИХ КОНТРОЛА ЗА
ОСНОВНЕ ТЕСТОВЕ ПРОВЈЕРЕ

PCR/IF и FISH тестови

Направити суспензију културе вирулентног изолата *C. m. subsp. sepedonicus* (NCPPB 4053 или PD 406) гајеног 72 часа на MTNA основној хранљивој подлози у 10 mM фосфатном пуферу концентрације приближно 1-2 · 10⁸ cfu/ml. То је обично слабо мут- на суспензија оптичке густине 0,20 на 600 nm.

Извадити конус пупчаног дијела из 200 кртола бијеле сорте кромпира за које је познато да нису заражене бактеријом *C. m. subsp. sepedonicus*.

Обрадити конусе уобичајеном методом и ресуспендовати та- лог у 10 ml.

Припремити десет стерилних микроепрувета од 1,5 ml са 900 µl ресуспендованог талога.

У прву микроепрувету додати 100 µl суспензије *C. m. subsp. sepedonicus* и измијешати на вортексу.

У сљедећих пет микроепрувета припремити децимална раз- рјеђења бактеријске суспензије.

Ових шест микроепрувета са зараженим екстрактом користи- ти за позитивну, а четири микроепрувете са незараженим екстрак- том користити за негативну контролу. У складу с тим, означити микроепрувете.

У микроепруветама од 1,5 ml припремити аликвоте од 100 µl тако да се добије девет копија сваког контролног узорка. До упо- требе чувати на температури од -16 °C до -24 °C.

Присуство и количину присутне *C. m. subsp. sepedonicus* у кон- тролним узорцима прво потврдити IF тестом.

За PCR тест извршити екстракцију ДНК у позитивним и не- гативним контролним узорцима за сваку серију узорака за тести- рање.

За IF и FISH тестове извршити тестирање позитивних и нега- тивних контролних узорака за сваку серију узорака за тестирање. Код IF, FISH и PCR тестова потребно је утврдити присуство *C. m. subsp. sepedonicus* у концентрацији од најмање 10³ и 10⁴ ћелија/ml код позитивних контрола и ни у једној негативној контроли.

Поглавље V
ПУФЕРИ ЗА ТЕСТ ПРОЦЕДУРЕ

Стерилисани пуфери који нису отворани могу се чувати до једне године.

1. Пуфери за екстракцију
 - 1.1. Екстракциони пуфер (50 mM фосфатни пуфер, pH 7,0)

Овај пуфер се користи за екстракцију бактерије из биљног тки- ва хомогенизацијом или трешењем.

Na₂HPO₄ (анхидровани) 4,26 g

KH₂PO₄ 2,72 g

Дестилована вода 1 l

Растворити састојке, провјерити pH и стерилисати у аутоклаву на 121 °C 15 минута.

Сљедећи састојци могу бити корисни:

	Намјена	Количина (по l)
Пахуљице Lubrol	Дефлокулант*	0,5 g
DC силикон против стварања пјене	Средство про- тив стварања пјене*	1 ml
Тетранатријум-пирофосфат	Антиоксидант	1 g
Polivinilpirolidon-40.000 (PVP-40)	Везивање PCR инхибитора	50 g
* За употребу код методе екстрак- ције хомогенизацијом.		

1.2. Пелет пуфер (пуфер за растварање талога - 10 mM фосфат- ни пуфер, pH 7,2)

Овај пуфер користи се за ресуспендовање и разрјеђивање екс- тракта конуса извађених из пупчаних дијелова кртола кромпира, послеије концентровања талога центрифугирањем.

Na₂HPO₄ · 12H₂O 2,7 g NaH₂PO₄ · 2H₂O 0,4 g

Дестилована вода 1 l

Растворити састојке, провјерити pH и стерилисати у аутоклаву на 121 °C 15 минута.

2. Пуфери за IF тест
 - 2.1. IF пуфер (10 mM фосфатни пуфер с додатком соли (ПБС), pH 7,2)

Овај пуфер се користи за разрјеђивање антицијела.

Na₂HPO₄ · 12H₂O 2,7 g

NaH₂PO₄ · 2H₂O 0,4 g

NaCl 8 g

Дестилована вода 1 l

Растворити састојке, провјерити pH и стерилисати у аутоклаву на 121 °C 15 минута.

2.2. IF пуфер - Tween

Овај пуфер користи се за испирање IF плочица. IF пуферу до- дати 0,1% Tween 20.

2.3. Фосфатни пуфер с глицеролом pH 7,6

Овај пуфер користи се као раствор за прекривање бунарчића у IF тесту како би се појачала флуоресценција.

Na₂HPO₄ · 12H₂O 3,2 g

NaH₂PO₄ · 2H₂O 0,15 g, глицерол 50 ml

Дестилована вода 100 ml

Комерцијални раствори нпр Vectashield® (Vector Laboratories) или Citifluor® (Leica).

Поглавље VI
ОДРЕЂИВАЊЕ НИВОА КОНТАМИНАЦИЈЕ У IF И FISH
ТЕСТОВИМА

1. Избројати просјечан број типичних флуоресцентних ћелија по видном пољу (с).

2. Извршати број типичних флуоресцентних ћелија по бунарчићу микроскопске плочице (C):

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

гдје је:

S = површина бунарчића 1F плочице са више бунарчића,

s = површина поља објектива.

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

гдје је:

i = коефицијент поља (варира од осам до 24, зависно од типа окулар),

K = коефицијент тубе - цијеви (1 или 1,25),

G = повећање објектива (100 пута, 40 пута итд.).

3. Израчунати број типичних флуоресцентних ћелија по ml ресуспендованог талога (N)

$$N = C \cdot 1000/u \cdot F,$$

гдје је:

u = запремина ресуспендованог талога у сваком бунарчићу,

F = фактор разријеђења ресуспендованог талога.

Поглавље VII
ХРАНЉИВЕ ПОДЛОГЕ ЗА ИЗОЛАЦИЈУ И ГАЈЕЊЕ *C. m. subsp. sepedonicus*

- 1. Опште хранљиве подлоге
 - 1.1. Хранљиви агар (NA)
Хранљиви агар (Difco) 23 g
Дестилована вода 1 l
Растворити састојке и стерилисати у аутоклаву на 121 °C 15 минута
 - 1.2. Хранљиви агар са декстрозом (NDA)
Difcobasto хранљиви агар који садржи 1% D (+) глюкозе (монохидрата). Стерилисати у аутоклаву на 115 °C 20 минута.
 - 1.3. Агар са квасцем, пептоном и глюкозом (YPGA)
Екстракт квасца (Difco) 5 g
Bacto пептон (Difco) 5 g
D (+) глюкоза (монохидрат) 10 g
Агар bacto (Difco) 15 g
Дестилисана вода 1 l
Растворити састојке и стерилисати у аутоклаву на 121 °C 15 минута
 - 1.4. Агар са екстрактом квасца и минералним солима (YGM)
Bacto екстракт квасца (Difco) 2 g
D (+) глюкоза (монохидрат) 2,5 g
K₂HPO₄ 0,25 g KH₂PO₄ 0,25 g
MgSO₄ · 7H₂O 0,1 g MnSO₄ · H₂O 0,015 g NaCl 0,05 g
FeSO₄ · 7H₂O 0,005 g
Bacto агар (Difco) 18 g
Дестилована вода 1 l
Растворити састојке и стерилисати 0,5 литара хранљиве подлоге у аутоклаву на 121 °C 15 минута.

- 2. Селективне хранљиве подлоге које су прошле валидацију
 - 2.1. MTNA хранљива подлога
Осим ако није другачије наведено, сви састојци су из BDH.
Екстракт квасца (Difco) 2 g
Манитол 2,5 g
K₂HPO₄ 0,25 g
KH₂PO₄ 0,25 g
NaCl 0,05 g
MgSO₄ · 7H₂O 0,1 g
MnSO₄ · H₂O 0,015 g
FeSO₄ · 7H₂O 0,005 g
Агар (Oxoid no.1) 16 g
Дестилована вода 1 l

Растворити састојке и подесити pH на 7,2. Након стерилизације у аутоклаву (на 121 °C у трајању од 15 минута) и хлађења на 50 °C, додати антибиотике: триметоприм 0,06 g, налидиксилну киселину 0,002 g, амфотерицин Б 0,01 g киселина (Sigma), (оба 5 mg/ml), у 96% етанолу, амфотерицин Б (Sigma), (1 mg/ml), у диметил сулфоксиду. Шток раствори стерилишу се филтрацијом.

Концентровани раствори антибиотика: триметоприм (Sigma) и налидиксилна киселина (Sigma), (оба 5 mg/ml), у 96% метанолу, амфотерицин Б (Sigma), (1 mg/ml), у диметил сулфоксиду.

- Напомена
- Рок трајања основне хранљиве подлоге је три мјесеца. Након што се додају антибиотици, рок трајања је мјесец дана, и то уколико се припремљена подлога чува у фрижидеру.
- 2.2. NCP-88
Хранљиви (Difco) 23 g
Екстракт квасца (Difco) 2 g
Д-манитол 5 g
K₂HPO₄ 2 g
KH₂PO₄ 0,5 g
MgSO₄ · 7H₂O 0,25 g
Дестилована вода 1 l

Растворите састојке и подесите pH на 7,2. Након стерилизације у аутоклаву (на 121 °C 15 минута и хлађења на 50 °C), додајте следеће антибиотике: полимиксин Б сулфат (Sigma) 0,003 g, налидиксилна киселина (Sigma) 0,008 g, циклохексимид (Sigma) 0,2 g.

Шток растворе антибиотика направити на следећи начин: растворити налидиксилну киселину у 0,01 M NaOH циклохексимида у 50% етанолу, полимиксин Б сулфат у дестилованој води. Основни раствори су стерилисани филтрирањем.

- Напомена
- Рок трајања основне хранљиве подлоге је три мјесеца. Након што се додају антибиотици, рок трајања је мјесец дана, и то када се чува у фрижидеру.

Поглавље VIII
ПОТВРЂЕНИ И ОДОБРЕНИ ПРОТОКОЛИ И РЕАГЕНСИ ЗА PCR

- Напомена
- ПРЕЛИМИНАРНА ТЕСТИРАЊА ТРЕБА ДА ОМОГУЋЕ ПОНОВЉИВУ ДЕТЕКЦИЈУ ОД НАЈМАЊЕ 10³ ДО 10⁴ ЋЕЛИЈА *C. m. subsp. sepedonicus* ПО ml ЕКСТРАКТА УЗОРКА.
- Током прелиминарних тестирања не смије доћи до појаве лажно позитивних резултата код одабраних бактеријских изолата.
- 1. Протокол за мултиплекс PCR са унутрашњом PCR контролом (Patrik, 2000)
 - 1.1. Олигонуклеотидни прајмери
Узводни прајмер PSA-1 5' - ctc ctt gtt ggg tgg gaa aa - 3'.
Низводни прајмер PSA-R 5' - tac tga gat gtt tca ctt ccc c - 3'.
Узводни прајмер NS-7-F 5' - gag gca ata aca ggt ctg tga tgc - 3'.
Низводни прајмер NS-8-R 5' - tcc gca ggt tca cct acg ga - 3'.
Очекивана дужина умноженог производа из ДНК *C. m. subsp. sepedonicus* = 502 bp (пар прајмера PSA).
Очекивана дужина умноженог производа из 18S рРНА унутрашње контроле = 377 bp (пар прајмера NS).
 - 1.2. PCR реакциони микс

Реагенс	Количина по реакцији	Конечна концентрација
Стерилна ултрачиста вода	15,725 µl	
10 · PCR пуфери ¹ (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1 · (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (фракција V) (10%)	0,25 µl	0,1%
Смјеса d-NTP (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Прајмер PSA-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Прајмер PSA-R (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Прајмер NS-7-F (10 µM) ²	0,1 µl	0,04 µM
Прајмер NS-8-R (10 µM) ²	0,1 µl	0,04 µM
Тақ полимјераза (5 U/µl) ¹	0,2 µl	1 U
Запремина узорка	5 µl	
Укупна запремина	25 µl	

⁽¹⁾ Валидација методе је извршена уз коришћење Тақ полимера-зе Perkin Elmer (Ampli Taq ili Gold) и Gibco BRL.

⁽²⁾ Оптимизација концентрације прајмера NS-7F и NS-8-R извршена је за екстракцију из пупчаног конуса кромпира методом хомогенизације и пречишћавања ДНК према Patrik (2000), (Поглавље II тачка 6. подт. 6.1. и 6.2).

Уколико се користи екстракција тресењем или нека друга метода изолације ДНК, потребно је извршити поновну оптимизацију концентрације реагенса.

- 1.3. Услови PCR реакције
- Извести сљедећи програм:
- а) један циклус: три минута на 95 °C (денатурација ланца ДНК);
 - б) десет циклуса: један минут на 95 °C (денатурација ланца ДНК);
 - в) један минут на 64 °C (везивање прајмера);
 - г) један минут на 72 °C (хибридизација);
 - д) 25 циклуса: 30 секунди на 95 °C (денатурација ланца ДНК);
 - ђ) 30 секунди на 62 °C (денатурација ланца ДНК);
 - е) један минут на 72 °C (продужавање копије);
 - ж) циклус: пет минута на 72 °C (коначно продужавање);
 - з) држати на 4 °C.

Напомена

Оптимални услови коришћења овог програма дефинисани су за коришћење на PCR MJ Research PTC 200 thermal cycler. Модификација трајања корака циклуса је вјероватно потребна у случају употребе других модела thermal cyclera.

1.4. Анализа продукта умножавања рестрикционим ензимом

PCR производи умножени из ДНК *C. m. subsp. sepedonicus* испољавају карактеристичне полиморфизме у дужини рестрикционих фрагмената са ензимом Bgl II после инкубације на 37 °C 30 минута. Рестрикциони фрагменти добијени из специфичног фрагмента *C. m. subsp. sepedonicus* су величине 282 bp и 220 bp.

2. Припрема боје за електрофорезу
- 2.1. Бромфенол плаво (10% концентровани раствор)
- Бромфенол плаво 5 g
- Дестилована вода (бидестилована) 50 ml
- 2.2. Пуфер за бојење
- Глицерол (86%) 3,5 ml
- Бромфенол плаво (5.1) 300 µl
- Дестилована вода (бидестилована) 6,2 ml
3. 10 · Трис-ацетатни и EDTA пуфер (ТАЕ), pH 8,0
- Трис пуфер 48 g
- Глацијална сирћетна киселина 11,42 ml
- EDTA (динатријумова со) 3,72 g
- Дестилована вода 1 l
- Разриједити једанпут прије употребе (нпр. Invitrogen или за-мјена).

Поглавље IX

ПОТВРЂЕНИ И ОДОБРЕНИ РЕАГЕНСИ ЗА FISH ТЕСТ

1. Олиго-пробе
- Специфична проба за *C. m. subsp. sepedonicus* CMS-CY3-01: 5' - ttg cgg ggc gca cat ctc tgc acg - 3'.
- Неспецифична еубактеријска проба EUB-338-FITC: 5' - gct gcc tcc cgt agg agt - 3'.

2. Раствор за фиксирање
- Раствор за фиксирање садржи параформалдехид, који је токсичан. Носити рукавице и не удисати га. Препоручује се рад у ди-гестору.
- Загријати 9 ml воде за употребу у процедурама молекуларне биологије (нпр. ултрачисте воде) на око 60 °C и додати 0,4 g параформалдехида. Параформалдехид се раствара после додавања пет капи 1N NaOH и мијешања на магнетној мјешалици.
- Подесити pH на 7 додајући 1 ml 0,1 M фосфатног пуфера (PB; pH 7,0) и пет капи 1 N HCl. Вриједност pH провјерити и помоћу индикатор трака и ако је потребно подесити pH помоћу HCl или NaOH. У растворима са параформалдехидом не употребљавати pH метар.
- Профилтрирати раствор кроз мембрански филтер од 0,22 µm и до даље употребе чувати на 4 °C и заштитити од прашине.
- Напомена
- Алтернативни раствор за фиксирање је 96% етанол.

3. 3 · Hybmix
- NaCl 2,7 M
- Tris-HCl 60 mM (pH 7,4)
- EDTA (филтер стерилисани у аутоклавама) 15 mM
- Разриједити до једанпут према потреби.

4. Раствор за хибридизацију
- 1 · Hybmix
- Натријум-додецил-сулфат (SDS) 0,01%
- Проба EUB 338 5 ng/µl
- Проба CMSCY301 5 ng/µl
- Припремити количине раствора за хибридизацију према про-рачунима у Табели 1. Предложене количине за припремање смјесе за хибридизацију (у даљем тексту: Табела 1). За сваку плочицу (са два различита узорка у дупликату) треба 90 µl раствора за хибри-дизацију.

Табела 1.

	двје плочице	осам плочица
Стерилна ултрачиста вода	50,1	200,4
3 · Hybmix	30	120
1% SDS	0,9	3,6
Проба EUB 338 (100 ng/µl)	4,5	18
Проба CMSCY301 (100 ng/µl)	4,5	18
Укупна запремина (µl)	90	360

Напомена

Све растворе који садрже олиго-пробе осјетљиве на свјетлост чувати у мраку на -20 °C. Током употребе заштитити их од директ-не сунчеве свјетлости или електричног свјетла.

5. 0,1 M фосфатни пуфер, pH 7,0
- Na₂HPO₄ 8,52g
- KH₂PO₄ 5,44 g
- Дестилована вода
- Растворити састојке, провјерити pH и стерилисати у аутоклаву на 121 °C 15 минута.

Поглавље X

ГАЈЕЊЕ ПЛАВОГ ПАТЛИЦАНА

Посијати сјеме плавог патлицана (*Solanum melongena*) у пасте-ризовани компост за сјеме. Пресадиити сијанце са потпуно развије-ним котиледонима (10 до 14 дана) у пастеризован компост у сак-сијама.

Плави патлициани треба да се гаји у стакленику под сљедећим условима:

- 1) дужина дана: 14 часова или природна дужина дана, ако је дужа од 14 часова,
 - 2) температура: дан: од 21 °C до 24 °C, ноћ: 15 °C.
- Осјетљиве сорте плавог патлицана: Black Beauty, Long Tom, Rima, Balsas.

Поглавље XI

ПОСТУПАК БОЈЕЊА ПОГРАМУ (HUCKEROVA МОДИФИКАЦИЈА), (DOETSCH, 1981)

- а) Раствор кристал виолет
- Растворите 2 g кристал виолет у 20 ml 95% етанола. Раствори-те 0,8 g амонијум-оксалата у 80 ml дестиловане воде. Помијешати два раствора.
- б) Луголов раствор
- Јод 1 g
- Калијум-јодид 2 g
- Дестилована вода 300 ml
- Уситнити састојке користећи тучак и аван. Додати састојке води и промијешати да се растворе у затвореној посуди.
- в) Раствор шафранина за контраст
- Основни раствор:
- шафранин О 2,5g,
 - 95% етанол 100 ml.
- Промијешати и чувати.
- Разриједити 1 : 10 за добијање радног раствора.
- Поступак бојења:
- 1. припремити размазе, осушити на ваздуху и фиксирати их загријавањем,
 - 2. плочицу прелити раствором кристал виолет и држати један минут,
 - 3. кратко испрати текућом водом,
 - 4. прелити Луголовим раствором један минут,

5. испрати текућом водом и просушити филтер-папиром,
 6. боју уклонити 95% етанолом, који се додаје кап по кап или се размаз урони на 30 секунди и лагано протресе,
 7. испрати текућом водом и просушити филтер-папиром,
 8. прелити раствором шафранина 10 секунди,
 9. испрати текућом водом и осушити филтер-папиром,
 10. Грам-позитивне бактерије боје се љубичасто-плаво, а Грам негативне бактерије боје се ружичасто-црвено.
-