

ŠEME ZA TESTIRANJE NA ŠTETNI ORGANIZAM *CLAVIBACTER SEPEDONICUS***1. OPŠTI PRINCIPI O PRISUSTVU ŠTETNOG ORGANIZMA**

- 1.1. Na prisustvo štetnog organizma sumnja se ako se dobije pozitivan rezultat prvim testom za detekciju (*detection test*) sprovedenim na određenom bilju.

Za biljni materijal sa simptomima, prvi test za detekciju može biti selektivna izolacija.

- 1.2. Prisustvo štetnog organizma na simptomatskim uzorcima određenog bilja je potvrđeno u sljedećim slučajevima:

- a) ako je prvi test za detekciju (*detection test*) štetnog organizma selektivna izolacija kojom se dobijaju kolonije tipične morfologije: pozitivni rezultati dobijeni su u dva identifikaciona testa (*identification tests*);
- b) ako prvi test za detekciju nije selektivna izolacija već neki drugi test:
 - pozitivni rezultati dobijeni su u dva identifikaciona testa nakon što se uzorak podvrgne selektivnoj izolaciji;
 - pozitivni rezultati dobijeni su u drugom testu za detekciju koji nije selektivna izolacija.

- 1.3. Prisustvo štetnog organizma na asimptomatskim uzorcima određenog bilja potvrđeno je u sljedećim slučajevima:

- a) kada je pozitivan rezultat dobijen drugim testom za detekciju, pod uslovom da je prvi ili drugi test za detekciju molekularni (zasnovan na DNK analizi) test (TaqMan® Real-time PCR ili konvencionalni PCR);
- b) za uzorke uzete iz države ili područja države za koje nije poznato da se u njima pojavljuje štetni organizam: ako je pozitivan rezultat dobijen drugim testom za detekciju u skladu sa tačkom a) i ako je dobijen pozitivan rezultati u dva identifikaciona testa izvršena nakon što su uzorci podvrgnuti selektivnom izdvajanju.

2. TESTOVI**2.1. Testovi za detekciju (*detection tests*)**

Testovi za detekciju odnosno otkrivanje prisustva štetnog organizma moraju biti takvi da se njima dosljedno detektuje najmanje 10^4 ćelija/ml resuspendovanog taloga.

Drugi test za detekciju mora biti zasnovan na drukčijim biološkim principima ili drukčijim nukleotidnim regionima u odnosu na prvi test za detekciju.

Testovi za detekciju su sljedeći:

- a) testovi imunofluorescencije, kako su opisani u međunarodnim dijagnostičkim standardima;
- b) FISH test (van Beuningen et al. (1995.)⁽¹⁾), kako je opisan u međunarodnim dijagnostičkim

- standardima;
- c) izolacija kako je opisano u međunarodnim dijagnostičkim standardima. Mora se upotrebiti jedna od sljedeće dvije opcije:
- direktna izolacija na poluselektivnoj (ili neselektivnoj) hranjivoj podlozi, kako je opisano u međunarodnim dijagnostičkim standardima;
 - nakon obogaćivanja biotestom, izolacija kako je opisano u međunarodnim dijagnostičkim standardima;
- d) konvencionalni PCR test uz upotrebu prajmera od Pastrik et al. (2002.) ⁽¹⁾, kako je opisan u međunarodnim dijagnostičkim standardima;
- e) TaqMan® Real-time PCR testovi uz upotrebu prajmera i proba koje su opisali:
- Schaad et al. (1999.) ⁽³⁾ kako je opisan u međunarodnim dijagnostičkim standardima;
 - Vreeburg et al. (2018.) ⁽⁴⁾ (takozvani NYtor test), kako je opisan u međunarodnim dijagnostičkim standardima;
 - Gudmestad et al. (2009.), kako su ga prilagodili Vreeburg et al. (2018.) ⁽⁴⁾, kako je opisan u međunarodnim dijagnostičkim standardima;
 - Massart et al. (2014.) ⁽⁵⁾, kako je opisan u međunarodnim dijagnostičkim standardima.

2.2. Identifikacioni testovi (*Identification tests*)

Identifikacioni testovi su sljedeći:

- a) test imunofluorescencije, kako je opisan u međunarodnim dijagnostičkim standardima;
- b) konvencionalni PCR test (Pastrik (2000.)), kako je opisan u međunarodnim dijagnostičkim standardima;
- c) TaqMan® Real-time PCR testovi uz upotrebu prajmera i proba koje su opisali:
- Schaad et al. (1999.), kako je opisan u međunarodnim dijagnostičkim standardima;
 - Vreeburg et al. (2018.) (takozvani Nytor test), kako je opisan u međunarodnim dijagnostičkim standardima;
 - Gudmestad et al. (2009.), kako su ga prilagodili Vreeburg et al. (2018.), kako je opisan u međunarodnim dijagnostičkim standardima;
 - Massart et al. (2014.), kako je opisan u međunarodnim dijagnostičkim standardima;
- d) DNK barkodiranje, kako je opisano u međunarodnim dijagnostičkim standardima;
- e) MALDI-TOF MS (Zaluga et al. (2011.) ⁽⁶⁾), kako je opisano u međunarodnim dijagnostičkim standardima.

⁽¹⁾ van Beuningen, A.R., Derks, H., Janse, J.D. (1995.). Detection and identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* with special attention to fluorescent in situ hybridization (FISH) using a 16S rRNA targeted oligonucleotide probe. *Züchtungs Forschung* 1, str. 266.–269.

⁽²⁾ Pastrik, K.H. (2000.). Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. *European Journal of Plant Pathology* 106, str. 155.–16

⁽³⁾ Schaad, W., Berthier-Schaad, Y., Sechler, A., Knorr, D. (1999.). Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIOPCR and an automated real-time fluorescence detection system. *Plant Disease* 83, str. 1095.–1100.

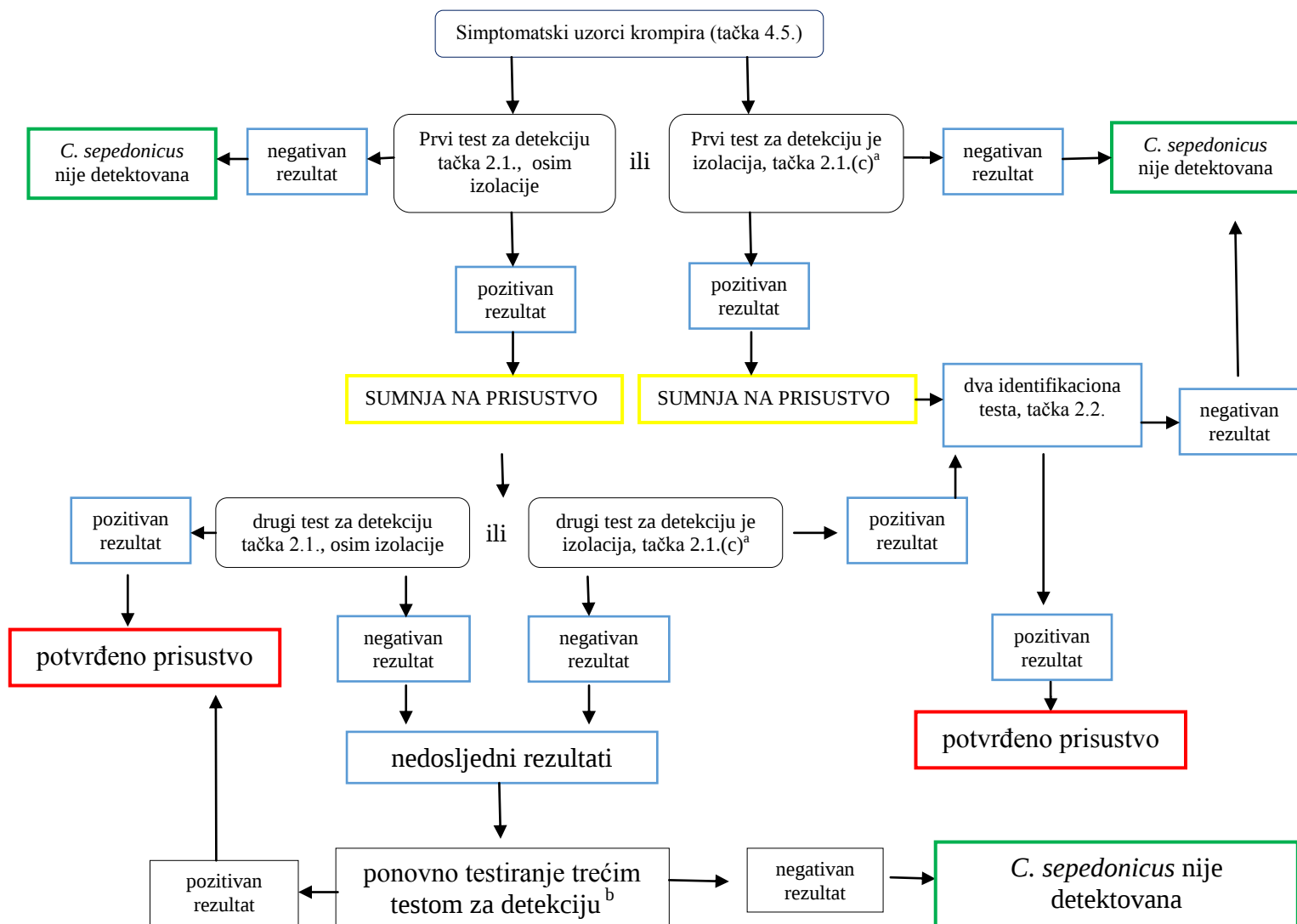
⁽⁴⁾ Vreeburg, R., Zendman, A., Pol A., Verheij, E., Nas, M., Kooman-Gersmann, M. (2018.). Validation of four real-time TaqMan PCRs for the detection of *Ralstonia solanacearum* and/or *Ralstonia pseudosolanacearum* and/or *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers using a statistical regression approach. *EPPO Bulletin* 48, str. 86.–96.

⁽⁵⁾ Massart, S., Nagy, C., Jijakli, M. H. (2014.). Development of the simultaneous detection of *Ralstonia solanacearum* race 3 and *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by a multiplex real-time PCR assay. *European Journal of Plant Pathology* 138, str. 29.–37.

⁽⁶⁾ Zaluga, J., Heylen, K., Van Hoorde, K., Hoste, B., Vaerenbergh, J., Maes, M., De Vos, P. (2011.). GyrB sequence analysis and MALDI-TOF MS as identification tools for plant pathogenic *Clavibacter*. *Systematic and applied microbiology* 34, str. 400.–407.
10.1016/j.syapm.2011.05.001

3. DIJAGRAMI POSTUPAKA

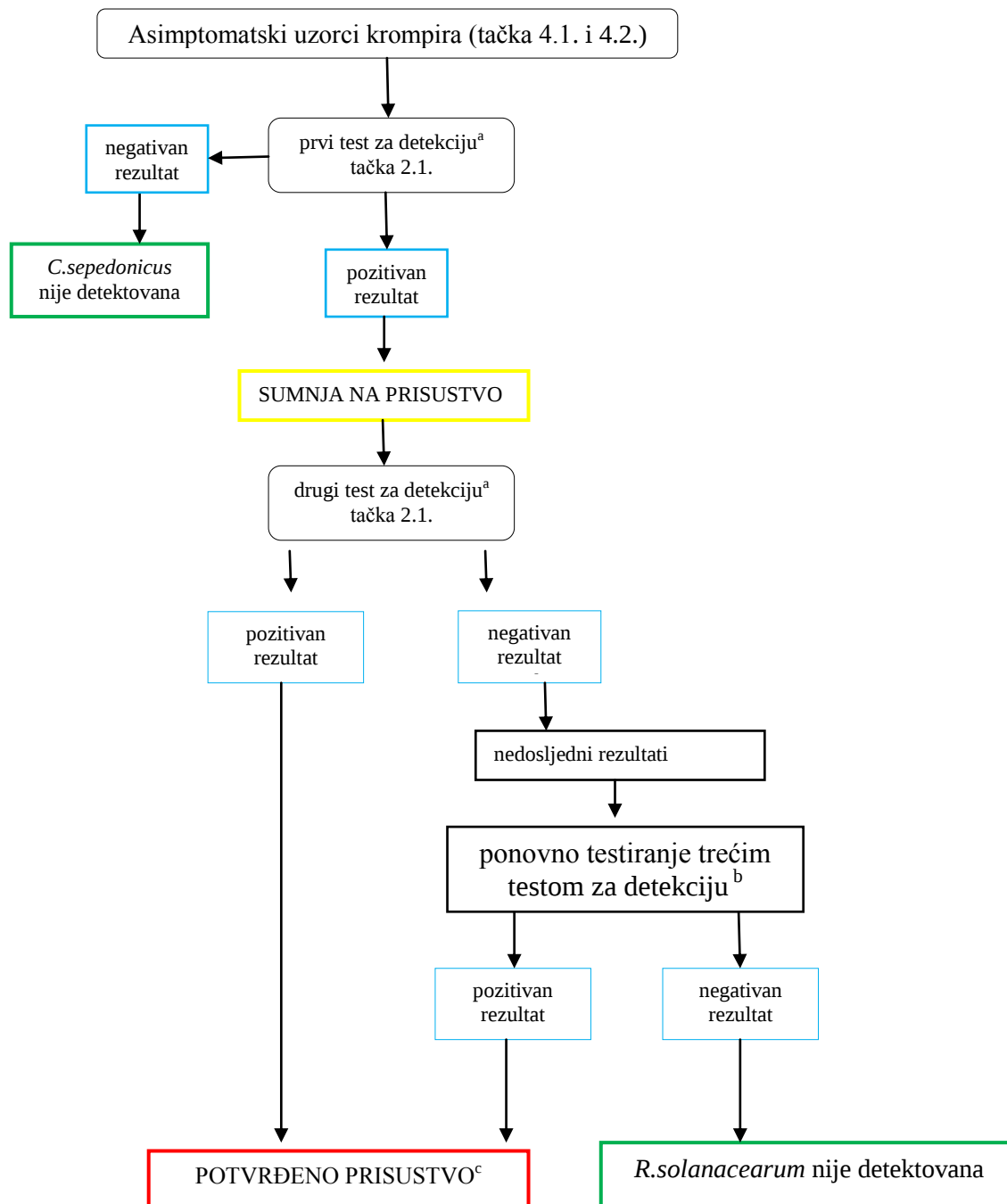
Dijagram br. 1: Dijagnostički postupak za utvrđivanje prisustva štetnog organizma u simptomatskim uzorcima određenog bilja.



^a Izolacija se može koristiti kao prvi ili drugi test za detekciju (detection test). Ako postoji sumnja na prisustvo štetnog organizma na hranjivoj podlozi, kolonije se moraju pročistiti kako bi se dobile čiste kulture na kojima se moraju izvršiti dva identifikaciona testa. Za potvrdu prisustva štetnog organizma rezultati oba identifikaciona testa treba da budu pozitivni.

^b Treći test za detekciju mora biti zasnovan na drukčijim biološkim principima ili drukčijim nukleotidnim regionima.

Dijagram br. 2: Dijagnostički postupak za utvrđivanje prisustva štetnog organizma u asimptomatskim uzorcima određenog bilja.



^a Izolacija se ne koristi.

^b Treći test za izolaciju zasniva se na drukčijim biološkim principima ili drukčijim nukleotidnim regionima. Izolacija se ne koristi.

^c Za uzorke iz tačke 1.3. podtačke (b), za potvrđivanje prisustva štetnog organizma nakon drugog pozitivnog testa za detekciju potrebno je izvršiti izolaciju štetnog organizma iz uzorka, nakon čega su potrebna dva pozitivna identifikaciona testa.

4. PRIPREMA UZORKA

4.1. Uzorci asimptomatskih krtola

Standardni uzorak mora da sadrži 200 krtola po testu. Odgovarajući laboratorijski postupak za obradu pupčanog dijela (*heel*) i konusa odnosno jezgara (*cores*) radi dobijanja ekstrakta za detekciju odnosno otkrivanje štetnog organizma opisan je u međunarodnim dijagnostičkim standardima.

4.2. Uzorci asimptomatskog biljnog materijala osim krtola

Detekcija odnosno otkrivanje latentnih zaraza mora da se sprovodi na zbirnim uzorcima dijelova stabljike. Postupak se može sprovesti na najviše 200 dijelova stabljike različitih biljaka u jednom uzorku. Odgovarajući laboratorijski postupak za dezinfekciju i obradu dijelova stabljike radi dobijanja ekstrakta za detekciju štetnog organizma opisan je u međunarodnim dijagnostičkim standardima.

4.3. Uzorci simptomatskog određenog bilja

Dijelovi tkiva moraju se aseptično ukloniti iz sprovodnog prstena u krtoli krompira ili iz sprovodnih snopića stabljike određenog bilja koje pokazuje simptome uvenuća. Odgovarajući laboratorijski postupak za obradu tih tkiva radi dobijanja ekstrakta za detekciju štetnog organizma detaljno je opisan u međunarodnim dijagnostičkim standardima.

**ELEMENTI ZA ODREĐIVANJE MOGUĆEG ŠIRENJA ŠETNOG ORGANIZMA I
OZNAČAVANJE PREDMETA KAO VJEROVATNO ZARAZENIH ŠETNIM
ORGANIZMOM**

1. Elementi koji se razmatraju radi određivanja mogućeg širenja šetnog organizma, u skladu sa članom 5 stavom 2 ovog pravilnika su sljedeći:
 - a) blizina drugih mjesta proizvodnje na kojima se uzgaja određeno bilje ili drugo bilje domaćini;
 - b) zajednička proizvodnja i upotreba zaliha sjemenskog krompira.
2. Elementi koji se uzimaju o obzir za označavanje određene kategorije kao vjerovatno zaražene šetnim organizmom, u skladu sa članom 5 stav 4 tačkom b su sljedeći:
 - a) određeno bilje uzgojeno na mjestu proizvodnje koje je označeno kao zaraženo u skladu sa članom 5 stav 5 tačkom a) ovog pravilnika;
 - b) mjesto ili mjesta proizvodnje koja su povezana sa proizvodnjom određenog bilja koje je označeno kao zaraženo u skladu sa članom 5 stav 5 tačkom a) ovog pravilnika, uključujući mjesta proizvodnje na kojima se direktno ili preko zajedničkog izvođača radova koriste ista oprema i objekti za proizvodnju;
 - c) određeno bilje koje je proizvedeno na mjestu ili mjestima proizvodnje iz podtačke b) ove tačke ili se nalazilo na takvim mjestima proizvodnje u vrijeme dok je određeno bilje označeno kao zaraženo u skladu sa članom 5 stav 5 tačkom a) ovog pravilnika bilo prisutno na mjestu proizvodnje iz podtačke a) ove tačke;
 - d) prostorije u kojima se rukuje određenim biljem iz mjesta proizvodnje iz podtač. a), b) i c) ove tačke;
 - e) sve mašine, vozila, posude, skladišta ili njihovi dijelovi i svi drugi predmeti, uključujući materijal za pakovanje, koji su mogli doći u kontakt sa određenim biljem koje je u skladu sa članom 5 stav 5 tačkom a) ovog pravilnika;
 - f) svo određeno bilje koje je bilo uskladišteno u bilo kojem objektu ili je bilo u kontaktu sa bilo kojim predmetom iz prethodne tačke prije čišćenja i dezinfekcije tih objekata i predmeta;
 - g) kao posljedica rezultata testiranja u skladu sa članom 7 ovog pravilnika, određeno bilje koje je klonski srodno određenom bilju koje je označeno kao zaraženo u skladu sa članom 5 stavom 5 tačkom a) ovog pravilnika i za koje se uprkos negativnom rezultatu testa na šetni organizam smatra da je vjerovatno zaraženo zbog klonske srodnosti. Može se sprovesti i test sortnosti kako bi se provjerio identitet zaraženih i klonski srodnih krtola ili biljaka;
 - h) mjesto ili mjesta proizvodnje određenog bilja iz podtačke g) ove tačke.

LISTA VEOMA ZARAŽENIH PODRUČJA

1. Teritorija države Poljske.
2. Teritorija države Rumunije.

FITOSANITARNE MJERE ZA ISKORJENJIVANJE ŠTETNOG ORGANIZMA

1. Određeno bilje koje je označeno kao zaraženo uništava se ili zbrinjava u skladu sa jednom ili više sljedećih fitosanitarnih mjera:

- a) upotreba kao hrana za životinje nakon toplotne obrade, na način da nema rizika od mogućnosti preživljavanja štetnog organizma;
- b) odlaganje na službeno odobreno mjesto za zbrinjavanje otpada na kojem nema utvrđenog rizika od širenja štetnog organizma u životnu sredinu, npr. cijedenjem kroz pore tla do poljoprivrednog zemljišta;
- c) spaljivanje;
- d) industrijska prerada tako da se direktno i odmah dopremi u pogon za preradu sa službeno odobrenim objektima za zbrinjavanje otpada za koji je dokazano da nema utvrđenog rizika od širenja štetnog organizma i u kojem postoji sistem za čišćenje i dezinfekciju najmanje onih prevoznih sredstava koja napuštaju pogon za preradu;
- e) druge mjere, pod uslovom da se dokaže da nema utvrđenog rizika od širenja štetnog organizma, a o ovim mjerama i njihovoj opravdanosti Uprava obavještava Evropsku Komisiju.

Sav preostali otpad koji je povezan sa prethodno navedenim mjerama ili je nastao kao rezultat tih mjera zbrinjava se primjenom metoda koje su službeno odobrene u skladu sa Prilogom 5.

2. Određeno bilje koje je označeno kao vjerovatno zaraženo u skladu sa članom 5 stav 5 tačkom b) ovog pravilnika, upotrebljava se na odgovarajući način ili zbrinjava, pod nadzorom Uprave. Uprava u zavisnosti od tipa određenog bilja, odobrava sljedeći način upotrebe i povezano zbrinjavanje otpada nastalog od tog određenog bilja:

- a) upotrijebiti ih kao krtole namijenjene prehrani, koje su pakovane na mjestu sa odgovarajućim objektima za zbrinjavanje otpada i koje su spremne za neposrednu isporuku i upotrebu bez naknadnog prepakivanja. Krtolama za sadnju može se rukovati na istom mjestu samo ako se to radi odvojeno ili nakon čišćenja i dezinfekcije; ili
- b) upotrijebiti ih kao krtole namijenjene industrijskoj preradi, uz direktnu i brzu dostavu do pogona za preradu sa odgovarajućim objektima za zbrinjavanje otpada i sistemom za čišćenje i dezinfekciju najmanje onih prevoznih sredstava koja napuštaju pogon za preradu; ili
- c) neki drugi način upotrebe ili zbrinjavanje, pod uslovom da se dokaže da nema utvrđenog rizika od širenja štetnog organizma i uz odobrenje Uprave;

3. Odgovarajuće metode za čišćenje i dezinfekciju predmeta iz člana 6 stav 5 ovog pravilnika su one za koje je utvrđeno da nema utvrđenog rizika od širenja štetnog organima i primjenjuju se pod nadzorom Uprave.

4. Mjere koje se preduzimaju u obilježenim područjima uspostavljenim u skladu sa članom 5 ovog pravilnika i na koja se upućuje u članu 6 stav 4 ovog pravilnika, obuhvataju sljedeće:

4.1. Mjere koje se preduzimaju na mjestima proizvodnje koja su u skladu sa članom 5 stav 2 tačka a) ovog pravilnika označena kao zaražena:

4.1.1. U proizvodnoj jedinici koja je u skladu sa članom 5 stav 5 tačka a) ovog pravilnika označena kao zaražena preduzimaju se sve mjere iz tač. 1, 2 i 3 ili sve mjere iz tač. 4 i 5:

- 1) tokom prve tri vegetacijske godine nakon godine u kojoj je utvrđena zaraza, uklanjanje samoniklog određenog bilja i zabrana sadnje određenog bilja, uključujući sjemeni, ili zasada za koje je utvrđen rizik od širenja štetnog organizma;
- 2) od četvrte godine nakon godine u kojoj je utvrđena zaraza, nakon što se ispune uslovi iz tačke 1 i pod uslovom da je tokom službenih kontrola u proizvodnoj jedinici u periodu od najmanje dvije uzastopne vegetacijske godine prije sadnje utvrđeno da je slobodna od samoniklog određenog bilja, dozvoljava se samo proizvodnja krtola koji nijesu namijenjene sadnji, a izvađene krtole moraju se testirati u skladu sa Prilogom 1;
- 3) nakon prve proizvodnje krtola u skladu sa tačkom 2 i nakon odgovarajućeg plodoređa od najmanje dvije godine ako bi se uzgajale krtole za sadnju, određeno bilje može se saditi radi proizvodnje ili krtola za sadnju ili drugih krtola i posebni nadzor se mora vršiti u skladu sa članom 3 ovog pravilnika; ili
- 4) tokom prve četiri vegetacijske godine nakon godine u kojoj je utvrđena zaraza, uklanjanje samoniklog određenog bilja i održavanje proizvodne jedinice na ugaru ili održavanje trajnih pašnjaka sa čestom niskom košnjom ili intenzivnom ispašom;
- 5) od pete godine nakon godine u kojoj je utvrđena zaraza, nakon što se ispune uslovi iz tačke 1 i pod uslovom da je tokom službenih kontrola u proizvodnoj jedinici u periodu od najmanje dvije uzastopne vegetacijske godine prije sadnje utvrđeno da je slobodna od samoniklog određenog bilja, dozvoljava se proizvodnja krtola za sadnju i drugih krtola, a izvađene krtole moraju se testirati u skladu sa Prilogom 1.

4.1.2. U svim ostalim proizvodnim jedinicama zaraženog mjesta proizvodnje, pod uslovom da je za svaku proizvodnu godinu Uprava utvrdila da je eliminisan rizik od pojave samoniklog određenog bilja i da je izvršeno testiranje izvađenog određenog bilja u svakoj proizvodnoj jedinici određenog bilja u skladu sa Prilogom 1, primjenjuju se sljedeće mjere:

- 1) u vegetacijskoj godini nakon godine u kojoj je utvrđena zaraza ne smije se saditi određeno bilje, uključujući sjeme, ili se mogu saditi sertifikovane krtole za sadnju radi proizvodnje samo krtola koje nijesu namijenjene sadnji;
- 2) u drugoj vegetacijskoj godini koja slijedi nakon godine u kojoj je utvrđena zaraza, sade se samo sertifikovane krtole za sadnju ili krtole za sadnju za koje je službenim testiranjem potvrđeno odsustvo štetnog organizma i koje su uzgajane su pod službenim nadzorom na mjestima proizvodnje koja nijesu navedena u tački 4 bilo za proizvodnju krtola za sadnju ili drugih krtola;
- 3) najmanje tri vegetacijske godine nakon godine u kojoj je utvrđena zaraza, sade se samo sertifikovane krtole za sadnju ili krtole za sadnju uzgajane pod službenim nadzorom od sertifikovanih krtola za sadnju, bilo za proizvodnju krtola za sadnju ili drugih krtola;
- 4) u svakoj vegetacijskoj godini iz tač. 1, 2 i 3 preduzimaju se mjere za uklanjanje samoniklog određenog bilja, ako je prisutno, i u svakoj proizvodnoj jedinici određenog bilja, izvađeno određeno bilje testira se u skladu sa Prilogom 1.

4.1.3. Odmah nakon utvrđivanja zaraze u skladu sa članom 5 stav 5 ovog pravilnika i nakon prve naredne vegetacijske godine, sve mašine i skladišne prostorije na mjestu proizvodnje koji se koriste u proizvodnji određenog bilja moraju se očistiti i gdje je odgovarajuće dezinfikovati primjenom odgovarajućih metoda iz tačke 3;

4.1.4. U jedinici za proizvodnju u zaštićenom prostoru koja je u skladu sa članom 5 stavom 5 tačkom a) ovog pravilnika označena kao zaražena, kada je moguća potpuna zamjena uzgojnog supstrata:

1) nije dozvoljena sadnja određenog bilja, uključujući sjeme, osim ako su ispunjeni sljedeći uslovi:

- a) uklanjanje (eliminisanje) štetnog organizma;
- b) uklanjanje cjelokupnog materijala biljaka domaćina;
- c) potpuna promjena uzgojnog supstrata kao i čišćenje i dezinfekcija proizvodne jedinice i sve opreme;
- d) odobrenja od strane Uprave da se obavlja proizvodnja određenog bilja;

2) proizvodnja krompira mora biti od sertifikovanih krtola za sadnju ili od minikrtola ili mikrobilja koje potiču iz testiranih izvora;

4.2 . Osim mjera iz tačke 4.1. u obilježenom području preduzimaju se i sljedeće mjere:

- 1) odmah nakon utvrđivanja zaraze, mora se osigurati da se sve mašine i skladišni prostori na tim mjestima proizvodnje i koji su povezani sa proizvodnjom određenog bilja, čiste i dezinfikuju na odgovarajući način i primjenom odgovarajućih metoda, kako je navedeno u tački 3.
- 2) odmah i tokom najmanje tri vegetacijske godine nakon godine u kojoj je utvrđena zaraza:
 - a) Uprava osigurava nadzor prostora gdje se uzgajaju krtole, skladište ili u kojima se njima rukuje, kao i mjesta proizvodnje na kojima se prema ugovoru upotrebljavaju mašine za proizvodnju određenog bilja;
 - b) vrši se sadnja samo sertifikovanih krtola za sadnju ili krtola za sadnju koje su uzgajane pod službenim kontrolom svih zasada određenog bilja u tom području i vršeno je testiranje krtola za sadnju nakon vađenja koje su uzgojene na mjestima proizvodnje koja su u skladu sa članom 5 stav 5 ovog pravilnika označene kao vjerovatno zaražene;
 - c) vrši se odvojeno rukovanje zaliham izvađenih krtola za sadnju od zaliha drugih krtola na svim mjestima proizvodnje unutar obilježenog područja ili sistem čišćenja i dezinfekcije koji se vrši između rukovanja zaliham krtola;
 - d) vrši se nadzor u skladu sa članom 3 stav 1 ovog pravilnika;
- 3) Uprava uspostavlja program, kada je to odgovarajuće, za zamjenu svih zaliha krtola za sadnju, u odgovarajućem vremenskom periodu.

Zahtjevi za službeno odobreno zbrinjavanje otpada

Službeno odobrene metode zbrinjavanja otpada iz Priloga 4 tačka 1 treba da budu u skladu sa sljedećim zahtjevima:

- a) Otpaci određenog bilja (uključujući odbačene krtole i koru krtola), kao i sav drugi čvrsti otpad povezan sa određenim biljem (uključujući zemlju, kamenje i druge ostatke) zbrinjavaju se primjenom jedne od sljedećih metoda a otpad se prevozi direktno na mjesto predviđeno za odlaganje, u zatvorenom prevoznom sredstvu, tako da ne postoji opasnost od njegova ispadanja;
- b) odlaganje na službeno odobreno mjesto za zbrinjavanje otpada na kojem nema utvrđenog rizika od širenja štetnog organizma u životnu sredinu, npr. cijedenjem kroz pore tla do poljoprivrednog zemljišta;
- c) spaljivanje;
- d) druge mjere, pod uslovom da se dokaže da nema utvrđenog rizika od širenja štetnog organizma, a o tim ovim mjerama Uprava obavještava Evropska Komisija.

2. Tečni otpad koji sadrži raspršene čvrste čestice prije zbrinjavanja se filtrira ili obrađuje postupkom taloženja radi uklanjanja čvrstih čestica u skladu sa tačkom 1.

Tečni otpad se:

- a) zagrijava do temperature od najmanje 60 °C u cijeloj količini najmanje 30 minuta prije zbrinjavanja; ili
- b) uz službeno odobrenje i pod službenim nadzorom na drugi način zbrinjava tako da nema utvrđenog rizika da otpad dođe u kontakt sa poljoprivrednim zemljištem.