**Příloha č. 2**

**Metody diagnózy, detekce a identifikace původce bakteriální kroužkovitosti bramboru, karanténní bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus***

Předložené postupové diagramy popisují různé postupy, které jsou součástí:

i) diagnózy kroužkovitosti v hlízách bramboru a rostlinách bramboru,

ii) detekce *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* ve vzorcích hlíz bramboru a rostlin bramboru,

iii) identifikace *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Obecné zásady

Protože protokoly obsahují zjištění karanténního organismu a zahrnují použití životaschopných kultur *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* jako kontrolních materiálů, je nutné pracovat za vhodných karanténních podmínek s odpovídajícím zařízením na odstraňování odpadů a za podmínek příslušných povolení vydaných rostlinolékařskou správou.

Testovací parametry musí zajistit stálé a reprodukovatelné zjištění úrovní *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* jako stanovené prahy vybraných metod.

Zcela nezbytná je příprava pozitivních kontrol.

Testování podle požadovaných prahů také zahrnuje správné nastavení, údržbu a kalibraci zařízení, pečlivé zacházení s činidly a jejich uchovávání a všechna opatření pro zamezení kontaminace mezi vzorky, např. oddělení pozitivních kontrol od testovaných vzorků. Musí být uplatněno standardní řízení kvality, aby se zabránilo administrativním a jiným chybám, zvláště při označování a v dokumentaci.

Podezření z výskytu naznačuje pozitivní výsledek z diagnostických nebo screeningových testů provedených na vzorku, jak je znázorněno v níže uvedených postupových diagramech.

Pokud je první screeningový test (IF nebo PCR/FISH) pozitivní, existuje podezření na infekci původcem kroužkovitosti a musí být proveden druhý screeningový test. Pokud je i druhý screeningový test pozitivní, pak je podezření z výskytu potvrzeno a musí se pokračovat v testování podle daného schématu. Pokud je druhý screeningový test negativní, pak vzorek není považován za infikovaný původcem kroužkovitosti.

Z tohoto důvodu se za pozitivní screeningový test považuje pozitivní výsledek IF testu potvrzený dalším testem, který je založen na jiném principu (PCR/FISH)“.

Potvrzená přítomnost vyžaduje izolaci a identifikaci čisté kultury *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* s potvrzením patogenity.

1. Použití postupových diagramů

1.1. Postupový diagram pro diagnózu původce bakteriální kroužkovitosti bramboru v hlízách bramboru a v rostlinách bramboru s příznaky bakteriální kroužkovitosti

Postup testování je určen pro hlízy a rostliny bramboru s podezřením z výskytu nebo typickými příznaky kroužkovitosti. Zahrnuje rychlý screeningový test, izolaci patogenu z infikovaného vodivého pletiva na živném médiu vhodném pro izolaci a kultivaci patogenu a v případě pozitivního výsledku identifikaci kultury *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Obrázek - Postupový diagram 1.1.A



------------------------------------------------------------------

1) Popis příznaků je v oddíle 2.

2) Vhodné testy jsou:

- IF test (oddíl 4),

- PCR test (oddíl 6),

- FISH test (oddíl 5).

3) Ačkoli izolace patogenu z rostlinného materiálu s typickými příznaky roztíráním suspenzí na média není komplikovaná, kultivace v pokročilých stádiích infekce se nemusí podařit. Saprofytické bakterie, které rostou na infikovaném pletivu, mohou přerůst nebo potlačovat patogen na izolačním médiu. Proto se doporučuje používat neselektivní i selektivní média, nejlépe MTNA (oddíl 8) nebo biotest (oddíl 7).

4) Popis typické morfologie kolonie je v oddíle 8.

5) Pokud je izolační zkouška negativní, ale příznaky choroby jsou typické, musí být izolace provedena znovu.

6) Spolehlivé identifikace čisté kultury *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* se dosáhne za použití testů uvedených v oddílu 9.

7) Zkouška patogenity je popsána v oddíle 10.

1.2. Postupový diagram pro diagnózu původce bakteriální kroužkovitosti bramboru ve vzorcích bezpříznakových hlíz bramboru

Postup testování je určen ke zjištění latentních infekcí v hlízách bramboru. Pozitivní výsledek z nejméně dvou screeningových testů, z nichž každý je založen na jiném biologickém principu, musí být doplněn izolací patogena, a následně, v případě izolace typických kolonií, potvrzením, že čistá kultura je *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Pozitivní výsledek pouze jednoho screeningového testu není dostačující k tomu, aby byl vzorek považován za podezřelý.

Screeningové a izolační testy musí umožnit detekční práh 103 - 10 4 buněk/ml resuspendované pelety zahrnutý jako pozitivní kontroly v každé sérii testů.

Obrázek - Postupový diagram 1.2.A



------------------------------------------------------------------

1) Standardní velikost vzorku je 200 hlíz, ačkoli postup lze použít i na menší počet, jestliže 200 hlíz není k dispozici.

2) Metody extrakce a koncentrace patogena jsou popsány v oddílu 3.1.

3) Pokud jsou alespoň dva testy založené na různých biologických principech pozitivní, musí být provedena izolace a potvrzení. Provede se nejméně jeden screeningový test. Pokud je tento test negativní, je vzorek považován za negativní. V případě, že je tento test pozitivní, je pro ověření prvního pozitivního výsledku nezbytný ještě jeden nebo více screeningových testů založených na různých biologických principech. Pokud je druhý nebo další test negativní, je vzorek považován na negativní. Další testy nejsou nutné.

4) Test imunofluorescence (IF).

Pro vyšetření IF se vždy použije polyklonální protilátka, další monoklonální protilátky umožní větší přesnost (viz oddíl 4).

5) PCR test.

Použijí se vhodná validovaná PCR činidla a protokoly (viz oddíl 6).

6) FISH test.

Použijí se validovaná činidla a protokoly (viz oddíl 5).

7) Selektivní izolace.

Toto může být v mnoha případech vhodná metoda pro přímou izolaci *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* za použití MTNA média nebo NCP-88 média a ředění resuspendované pelety 1/100. Typické kolonie lze získat během 3 - 10 dní po rozetření na médium. Kulturu patogena lze následně vyčistit a identifikovat. Pro úplné využití potenciálu test vyžaduje opatrnou přípravu pletiva z pupkové části, aby se omezily sekundární bakterie, které jsou konkurencí *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* na médiu a které mohou patogena přerůst. Pokud se kultivační metoda takto nepodaří, musí být izolace provedena z rostlin použitých pro biotest (viz oddíl 8).

8) Biotest se používá k izolaci *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* z pelet bramborových extraktů pomocí selektivního obohacení v rostlinách lilku vejcoplodého (*Solanum melongena*). Test vyžaduje optimální inkubační podmínky stanovené pro tuto metodu. Bakteriální inhibitory *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* na MTNA nebo NCP-88 médiu pravděpodobně tento test narušovat nebudou (viz oddíl 7).

9) Typická morfologie kolonie je popsána v oddílu 8.

10) Kultivace nebo biotesty mohou selhat z důvodů konkurence nebo inhibice saprofytickými bakteriemi. Pokud jsou výsledky screeningových testů pozitivní, ale izolační testy negativní, opakují se izolační testy ze stejné pelety nebo dodatečným odebráním vodivého pletiva z blízkosti pupkového konce hlíz stejného vzorku a v případě potřeby se provede test dalších vzorků.

11) Spolehlivá identifikace čistých kultur podezřelých na *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* se dosáhne použitím testů popsaných v oddílu 9.

12) Test patogenity je popsán v oddílu 10.

1.3. Postupový diagram pro diagnózu původce bakteriální kroužkovitosti bramboru ve vzorcích bezpříznakových rostlin bramboru

Obrázek - Postupový diagram 1.3.A



------------------------------------------------------------------

1) Doporučené velikosti vzorků - viz oddíl 3.2.

2) Metody extrakce a koncentrace patogenu jsou popsány v oddílu 3.2.

3) Pokud jsou alespoň dva testy založené na různých biologických principech pozitivní, musí být provedena izolace a potvrzení. Provede se nejméně jeden screeningový test. Pokud je tento test negativní, je vzorek považován za negativní. V případě, že je tento test pozitivní, je pro ověření prvního pozitivního výsledku nezbytné provedení druhého nebo více screeningových testů založených na různých biologických principech. Pokud je druhý nebo další test negativní, je vzorek považován za negativní. Další testy nejsou nutné.

4) Selektivní izolační test a typická morfologie kolonie jsou popsány v oddílu 8.

5) IF test je popsán v oddílu 4.

6) PCR test je popsán v oddílu 6.

7) FISH test je popsán v oddílu 5.

8) Biotest je popsán v oddílu 7.

9) Kultivace nebo biotest mohou selhat z důvodů konkurence nebo inhibice saprofytickými bakteriemi. Pokud jsou výsledky screeningových testů pozitivní, ale izolační testy jsou negativní, opakují se izolační testy a v případě potřeby se provede test dalších vzorků.

10) Spolehlivé identifikace čistých kultur, u kterých je podezření, že se jedná o *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus,* se dosáhne pomocí testů popsaných v oddílu 9.

11) Test patogenity je popsán v oddílu 10.

2. Vizuální vyšetření na přítomnost příznaků bakteriální kroužkovitosti bramboru

2.1. Rostliny bramboru

V evropských klimatických podmínkách se příznaky na poli zjistí jen zřídkakdy a často pak až na konci sezóny. Kromě toho jsou příznaky skryté nebo se zamění s příznaky jiných chorob, stáří nebo mechanických poškození. Proto mohou být příznaky při kontrole na poli snadno přehlédnuty. Příznaky vadnutí jsou velmi odlišné od příznaků hnědé hniloby; vadnutí je obvykle pomalé a zpočátku omezené na okraje listů. Mladé infikované listy často i přes infekci nadále rostou, i když růst v infikovaných místech je omezený. Tím vznikají neobvykle tvarované listy. Listy postižené ucpáním vodivých pletiv na spodní části stonku často mají chlorotické, žluté až oranžové mezižeberní partie. Infikované děložní lístky, listy a dokonce stonky mohou eventuálně odumřít. Často jsou listy a hlízy pouze menší. Příležitostně jsou rostliny zakrnělé. Barevné snímky řady příznaků jsou na internetové stránce http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main.

2.2. Hlízy bramboru

Nejranějšími příznaky jsou slabá sklovitost nebo průsvitnost pletiva bez měknutí v okolí cévního systému, zejména blízko pupku. Prstenec svazků cévních na pupkovém konci hlízy může mít nepatrně tmavší zbarvení než obvykle. Prvním dobře identifikovaným příznakem je žlutavé zabarvení prstence cévních svazků a stav, kdy při jemném zmáčknutí hlízy vystupují z cév sloupky sýrovité hmoty. Tento exsudát obsahuje miliony bakterií. Vodivá pletiva mohou zhnědnout a příznaky na hlízách jsou v tomto stádiu podobné příznakům hnědé hniloby způsobené bakterií *Ralstonia solanacearum*. Zpočátku mohou být tyto příznaky omezeny na jednu část prstence, nemusí se vyskytovat jen blízko pupkové části a mohou se postupně šířit na celý prstenec. S postupem infekce dochází k destrukci vodivých pletiv: vnější korová část se může oddělit od vnitřní korové části. V pokročilých stadiích infekce se objevují na povrchu hlízy praskliny, často s červenohnědými okraji. V poslední době se v Evropě objevilo několik případů, kdy střední kůra hnije s prstencem svazků cévních, čímž dochází k druhotnému poškození se vznikem vnitřních dutin a nekrózy. Druhotná houbová nebo bakteriální infekce může příznaky maskovat a může být obtížné, ne-li nemožné, rozlišit pokročilé příznaky kroužkovitosti od jiných hnilob bramboru. Možné jsou i atypické příznaky. Barevné snímky řady příznaků jsou na internetové stránce http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main.

3. Příprava vzorků

3.1. Hlízy bramboru

Poznámka:

- Standardní velikost vzorku je 200 hlíz na 1 test. Intenzivnější vzorkování vyžaduje více testů na vzorcích této velikosti. Větší množství hlíz ve vzorku vede k zpomalení nebo složitějšímu výkladu výsledků. Postup však lze vhodně použít i pro vzorky s méně než 200 hlízami, pokud je k dispozici menší množství hlíz.

- Validace všech níže uvedených zjišťovacích metod je založená na testování vzorků o velikosti 200 hlíz.

- bramborový extrakt lze použít také pro zjištění původce hnědé hniloby, *Ralstonia solanacearum*.

3.2. Rostliny bramboru

Poznámka:

Pro zjištění latentních populací *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* se doporučuje kontrola kombinovaných vzorků. Postup je vhodný pro kombinované vzorky až 200 částí stonků. (Pokud se provádí podrobné průzkumy, měly by být založeny na statisticky reprezentativním vzorku rostlinné populace, která je předmětem vyšetřování.)

4. IF test

Princip

Doporučuje se použít IF test jako hlavní screeningový test, protože byla prokázána jeho schopnost dosáhnout požadovaných prahů.

Použije-li se jako hlavní screeningový test a jeho výsledek je pozitivní, musí být jako druhý screeningový test proveden test PCR nebo FISH. Jestliže se test IF použije jako druhý screeningový test a jeho výsledek je pozitivní, je pro dokončení analýzy nutné další testování podle postupového diagramu.

Poznámka:

Pokud je IF test používán jako hlavní vyšetřovací test, používá se vždy polyklonální protilátka. V případě pozitivního výsledku IF testu s polyklonální protilátkou může být další vyšetření vzorku s monoklonální protilátkou přesnější, ale méně citlivé.

5. Test FISH

Princip

Když se jako první screeningový test použije FISH test a je pozitivní, musí být jako druhý povinný screeningový test proveden IF test. Když se FISH test provede jako druhý screeningový test a je pozitivní, je k dokončení diagnózy nutné další testování podle postupového diagramu.

6. PCR test

Princip

Použije-li se PCR test jako hlavní screeningový test a je pozitivní, musí být jako druhý povinný screeningový test proveden IF test. Pokud se PCR test používá jako druhý screeningový test a je pozitivní, je pro dokončení diagnózy nutné další testování podle postupového diagramu.

Využití této metody v celém rozsahu jako hlavního screeningového testu se doporučuje jen tehdy, je-li požadována specializovaná expertíza.

Poznámka:

Předběžné testování touto metodou by mělo umožnit reprodukovatelné zjištění 103 - 10 4 buněk *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* na 1 ml přidaných do vzorku extraktů, které byly předtím testovány s negativním výsledkem. Pro dosažení maximální citlivosti a přesnosti ve všech laboratořích mohou být vyžadovány optimalizační pokusy.

Používají se validovaná PCR činidla a protokoly. Přednostně se používá metoda s interní kontrolou.

Je třeba použít vhodná bezpečnostní opatření, aby se zabránilo kontaminaci vzorku cílovou DNA. PCR test by měli provádět zkušení laboranti v laboratořích specializovaných na molekulární biologii, aby se minimalizovala možnost kontaminace cílovou DNA. S negativními kontrolami (u průběhu extrakce DNA a PCR) by se mělo vždy zacházet jako s konečnými vzorky, aby bylo jasné, jestli došlo k přenosu DNA.

7. Test na lilku vejcoplodém

Poznámka:

Předběžné testování touto metodou by mělo umožnit reprodukovatelné zjištění 103 - 10 4 jednotek *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* tvořících kolonie na 1 ml přidaný k extraktům ze vzorku, které byly testovány s negativním výsledkem.

Nejvyšší citlivost zjištění lze očekávat při použití čerstvě připraveného extraktu ze vzorku a optimálních růstových podmínkách. Metodu však lze úspěšně použít i na extrakty, které byly uchovávány v glycerolu při teplotě -68 až -86 °C.

Některé odrůdy lilku vejcoplodého poskytují vynikající selektivní obohacující médium pro růst *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* dokonce v případě nepřítomnosti příznaků a poskytují také vynikající základní konfirmační test.

Pro omezení nebezpečí falešně negativních výsledků by měly být vytvořeny optimální růstové podmínky.

8. Izolace *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

Diagnóza může být potvrzena pouze tehdy, je-li původce kroužkovitosti izolován a takto identifikován. Ačkoliv je původce kroužkovitosti náročným organismem, je možno ho izolovat z pletiv projevujících příznaky napadení.

Mohou jej však přerůst rychle rostoucí saprofytické bakterie, a proto se nedoporučuje provádět izolaci přímo z pelety pletiva hlízy nebo stonku. Přímá izolace *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* je možná za použití selektivního média a vhodného ředění resuspendované pelety z pupkové části hlízy nebo ze stonků rostliny.

Izolace se provádí ze všech hlíz bramboru nebo částí stonku a z rostlin lilku vejcoplodého, které nevykazují příznaky napadení, ale u nichž byl pozitivní výsledek v testu IF/PCR složených vzorků.

9. Identifikace

Čisté kultury pravděpodobné izolované kultury *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* se identifikují za použití nejméně dvou následujících testů založených na různých biologických principech.

V případě potřeby se zahrne pro každý provedený test známý referenční kmen.

9.1. Nutriční a enzymatické identifikační testy

Zjišťují se následující fenotypické vlastnosti. Veškerá média by se měla inkubovat při 21 °C a po šesti dnech by měla být vyhodnocena. Pokud nedošlo k žádnému růstu, inkubuje se po dobu nejvýše 20 dní.

Všechny testy musí zahrnovat kontrolu se známým kmenem *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Nutriční a fyziologické testy se musí provádět za použití inokula ze subkultur živného agaru. Morfologická srovnání se musí provádět z kultur z živného dextrózového agaru.

9.2. IF test

 Připraví se suspenze přibližně 106 buněk/ml v pufru na IF. Provede se IF postup. Pozitivního výsledku IF testu je dosaženo, jestliže IF titr kultury odpovídá titru pozitivní kontroly.

9.3. PCR test

Připraví se suspenze přibližně 10 6 buněk na ml ve sterilní vodě (UPW).

Identifikace *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* je pozitivní, pokud jsou amplikony PCR stejné velikosti a mají stejnou mnohotvárnost délky fragmentu jako pozitivní kontrolní kmen.

9.4. FISH test

Připraví se suspenze přibližně 10 6 buněk na ml v UPW. Provede se postup FISH. Test FISH je pozitivní, jsou-li dosaženy stejné reakce kultury a pozitivní kontroly.

9.5. Analýza mastných kyselin (FAP)

Kultura se pěstuje na tryptikázo-sójovém agaru (Oxoid) po dobu 72 hodin při teplotě 21 °C (+/- 1 °C).

Použije se vhodný postup FAP (Janse, 1991; Stead, 1992). Test FAP je pozitivní, pokud je profil podezřelé kultury identický s profilem pozitivní kontroly.

9.6. BOX-PCR

Připraví se suspenze přibližně 10 6 buněk na ml v UPW. Provede se test postupem podle Smith et al., 2001.

10. Test patogenity

Pro konečné potvrzení původce kroužkovitosti a pro stanovení virulence kultur identifikovaných jako *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* musí být provedena zkouška patogenity.