**Příloha č. 3**

**Metody diagnózy, detekce a identifikace původce bakteriální hnědé hniloby bramboru a rajčete, karanténní bakterie *Ralstonia solanacearum***

Postupové diagramy popisují různé postupy, které jsou součástí:

i) diagnózy hnědé hniloby v hlízách bramboru a bakteriálního vadnutí bramboru, rajčete a některých dalších hostitelských rostlin,

ii) detekce *Ralstonia solanacearum* ve vzorcích hlíz bramboru, rostlin bramboru, rostlin rajčete a jiných hostitelských rostlin, a ve vzorcích vody a půdy,

iii) identifikace *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*)

Obecné zásady

Protože protokoly obsahují zjištění karanténního organismu a zahrnují použití životaschopných kultur *R. solanacearum* jako kontrolních materiálů, je nutné pracovat za vhodných karanténních podmínek s odpovídajícím zařízením na odstraňování odpadů a za podmínek stanovených příslušným povolením rostlinolékařské správy.

Testovací parametry musí zajišťovat stálé a reprodukovatelné zjištění úrovní *R. solanacearum* jako stanovené prahy vybraných metod.

Zcela nezbytná je přesná 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. První pozitivní screeningový test (test IF, PCR/FISH, selektivní izolace) musí být potvrzen druhým screeningovým testem, který je založen na jiném biologickém principu.

Pokud je první screeningový test pozitivní, existuje podezření na infekci *R. solanacearum* a musí být proveden druhý screeningový test. Pokud je i druhý screeningový test pozitivní, pak je podezření potvrzeno a musí se pokračovat v testování podle daného schématu. Jestliže je druhý screeningový test negativní, pak vzorek není považován za infikovaný *R. solanacearum*.

Potvrzená přítomnost vyžaduje izolaci a identifikaci čisté kultury *R. solanacearum* s potvrzením patogenity.

1. Použití postupových diagramů

1.1. Postupový diagram pro detekci původce bakteriální hnědé hniloby bramboru, rajčete a jiných hostitelských rostlin s příznaky bakteriální hnědé hniloby

Postup testování je určen pro hlízy a rostliny s podezřením z výskytu nebo typickými příznaky bakteriální hnědé hniloby. Zahrnuje rychlý screeningový test, izolaci patogenu z infikovaného vodivého pletiva na selektivní živné půdě a v případě pozitivního výsledku identifikaci kultury *Ralstonia solanacearum*.

Obrázek - Postupový diagram 1.1.B



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

1) Popis příznaků se nachází v oddíle 2.1.

2) Rychlé diagnostické testy usnadňují předběžnou diagnózu, ale nejsou dokonalé. Negativní výsledek naznačuje vždy nepřítomnost patogenu.

3) Test na výtok slizu ze svazků cévních stonku je popsán v oddíle 6.1.1.

4) Test na přítomnost granulí poly-b-hydroxybutyrátu je popsán v oddíle 6.1.2.

5) Sérologické aglutinační testy bakteriálního slizu nebo extraktů z pletiva vykazujícího příznaky jsou popsány v oddíle 6.1.3.

6) Test IF bakteriálního slizu suspendovaného ve vodě nebo extraktech pletiva vykazujícího příznaky je popsán v oddíle 6.1.5.

7) Test FISH bakteriálního slizu suspendovaného ve vodě nebo extraktech pletiva vykazujícího příznaky je popsán v oddíle 6.1.7.

8) Test ELISA bakteriálního slizu suspendovaného ve vodě nebo extraktech pletiva vykazujícího příznaky je popsán v oddíle 6.1.8.

9) Test PCR bakteriálního slizu suspendovaného ve vodě nebo extraktech pletiva vykazujícího příznaky je popsán v oddíle 6.1.6.

10) Patogen je obvykle snadno izolovatelný z rostlinného materiálu vykazujícího příznaky metodou zřeďovacích roztěrů (postupným ředěním) - viz. v oddíle 2.3.

11) Typická morfologie kolonie je popsána v oddíle 2.3.d.

12) Kultivace může selhat při pokročilých fázích infekce z důvodů konkurence nebo bujného růstu saprofytických bakterií. Jestliže jsou příznaky infekce typické, ale izolační test je negativní, musí se izolace opakovat, nejlépe kultivací na selektivních živných půdách.

13) Spolehlivá identifikace čistých kultur *R. solanacearum* se provede pomocí testů popsaných v bodu 6.2. Dílčí specifická charakteristika je nepovinná, ale doporučuje se pro každý nový případ.

14) Test patogenity je popsán v bodu 6.3.

1.2.(1) Postupový diagram pro detekci a identifikaci karanténní bakterie *Ralstonia solanacearum* ve vzorcích hlíz bramboru nevykazujících příznaky choroby

Testování je určeno ke zjištění latentních infekcí v hlízách bramboru. Pozitivní výsledek alespoň ze dvou screeningových testů (viz poznámka v diagramu 3), z nichž každý je založen na jiném biologickém principu, musí být doplněn izolací patogenu a dále, v případě izolace typických kolonií, potvrzením, že čistá kultura je *R. solanacearum*. Pozitivní výsledek pouze z jednoho screeningového testu není dostačující k tomu, aby byl vzorek považován za podezřelý. Screeningové testy a izolační testy musí umožnit detekční práh 103 - 104 buněk/ml resuspendované pelety zahrnutý jako pozitivní kontroly v každé sérii testů.

Obrázek - Postupový diagram 1.2.B-1



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

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

2) Metody extrakce a koncentrace patogenu jsou popsány v oddíle 3.1.1.

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

4) Test IF je popsán v oddíle 6.1.5.

5) Test selektivní izolace je popsán v oddíle 6.1.4.

6) Testy PCR jsou popsány v oddíle 6.1.6.

7) Test FISH je popsán v oddíle 6.1.7.

8) Testy ELISA jsou popsány v oddíle 6.1.8.

9) Biotest je popsán v oddíle 6.1.9.

10) Typická morfologie kolonie je popsána v oddíle 2.3.d.

11) Kultivace nebo biotest mohou selhat z důvodů konkurence nebo inhibice saprofytickými bakteriemi. Jsou-li ve screeningových testech získány pozitivní výsledky, ale izolační testy jsou negativní, je třeba opakovat izolační testy ze stejné pelety nebo dodatečným odebráním vodivého pletiva z blízkosti pupkového konce hlíz stejného vzorku, případně provést test s dalšími vzorky.

12) Spolehlivé identifikace čistých kultur podezřelých na *R. solanacearum* se dosáhne pomocí testů popsaných v oddíle 6.2.

13) Test patogenity je popsán v oddíle 6.3.

1.2.(2) Postupový diagram pro detekci a identifikaci karanténní bakterie *Ralstonia solanacearum* ve vzorcích rostlin bramboru nevykazujících příznaky choroby, rostlin rajčete nevykazujících příznaky choroby nebo rostlin jiných hostitelských rostlin nevykazujících příznaky choroby

Obrázek - Postupový diagram 1.2.B-2



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

1) Viz. oddíl 3.2.1. , kde jsou uvedeny doporučené velikosti vzorků.

2) Metody extrakce a koncentrace patogenu jsou popsány v oddíle 3.2.1.

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

4) Selektivní izolační test je popsán v oddíle 6.1.4.

5) Test IF je popsán v oddíle 6.1.5.

6) Testy PCR jsou popsány v oddíle 6.1.6.

7) Test FISH je popsán v oddíle 6.1.7.

8) Testy ELISA jsou popsány v oddíle 6.1.8.

9) Biotest je popsán v oddíle 6.1.9.

10) Typická morfologie kolonie je popsána v oddíle 2.3.d.

11) Kultivace nebo biotest mohou selhat z důvodů konkurence nebo inhibice saprofytickými bakteriemi. Jsou-li ve screeningových testech získány pozitivní výsledky, ale izolační testy jsou negativní, opakují se izolační testy.

12) Spolehlivé identifikace čistých kultur, u kterých je podezření, že se jedná o *R. solanacearum*, se dosáhne pomocí testů popsaných v oddíle 6.2.

13) Test patogenity je popsán v oddíle 6.3.

2. Diagnóza původce bakteriální hnědé hniloby

2.1. Příznaky

2.1.1. Příznaky u bramboru

Rostlina bramboru. Raná fáze infekce v polních podmínkách se rozpozná vadnutím listů směrem k vrcholu rostliny při vysokých teplotách během dne, přičemž v noci dochází k zotavení. V raných fázích vadnutí zůstávají listy zelené, ale později žloutnou a objevují se hnědé nekrózy. Dochází také k ohýbání listů dolů. Vadnutí jednoho výhonku nebo celé rostliny se rychle stává nevratným a končí kolapsem a uhynutím rostliny. Z cévních svazků napříč uříznutých stonků zvadlých rostlin obvykle vytéká hnědý a mléčný bakteriální sliz nebo je možné sliz vymáčknout. Při ponoření uříznutého stonku svisle do vody se z cévních svazků táhnou vlákna slizu.

Hlíza bramboru. Hlízy bramboru je třeba překrojit napříč u pupkového konce a podélně přes pupkový konec. V rané fázi se infekce pozná podle láhvově žlutého až světle hnědého zabarvení cévního prstence, ze kterého po několika minutách začne prýštit bledý krémový bakteriální sliz. Později se cévní zbarvení stává výrazněji hnědým a odumření se může rozšířit do parenchymatického pletiva. V pokročilejších fázích se infekce rozšíří vně od pupkového konce hlízy a z oček může vytékat bakteriální sliz, na který se přilepují částice půdy. Na slupce se mohou objevit červenohnědá, lehce propadlá místa jako důsledek vnitřního kolapsu cévního pletiva. V pokročilejších fázích infekce je obvyklý sekundární rozvoj měkkých hnilob bakteriálního a houbového původu.

2.1.2. Příznaky u rajčete

Rostlina rajčete. Prvním viditelným příznakem je povadlý vzhled nejmladších listů. Za příznivých podmínek pro patogen (teplota půdy kolem 25 °C, při nasycené vzdušné vlhkosti) se během několika málo dní rozvine kroucení listů směrem dolů a vadnutí na jedné straně rostliny nebo celé rostliny, které končí jejím úplným odumřením. Za méně příznivých podmínek pro patogen (teplota půdy méně než 21 °C) rostlina tolik nevadne, ale na stonku se může tvořit větší počet postranních výhonů. Je možné pozorovat vodou nasáklé pruhy od spodu stonku, které jsou dokladem odumírání cévního systému. Při příčném řezu stonkem vylučují hnědě zbarvená vodivá pletiva bílý nebo nažloutlý bakteriální sliz.

2.1.3. Příznaky u jiných hostitelů

Rostliny *Solanum dulcamara* a *S. nigrum*. Za normálních podmínek jsou u těchto plevelných hostitelských rostlin zřídkakdy pozorovány příznaky vadnutí, pokud teploty půdy nepřevyšují 25 °C nebo není extrémně vysoká koncentrace inokula (např. u rostliny *S. nigrum* rostoucí u nemocné rostliny bramboru nebo rajčete). Při vadnutí jsou příznaky stejné jako u rostliny rajčete. Nevadnoucí rostliny *S. dulcamara*, která má stonky a kořeny ve vodě, mohou vykazovat vnitřní světle hnědé zbarvení vodivých pletiv na příčném řezu spodní části stonku nebo částí stonku pod vodou. Z řezu cévních svazků mohou vytékat bakterie nebo mohou tvořit vlákna slizu, jestliže je řez stonku ponořen svisle do vody, a to i při absenci příznaků vadnutí.

2.2. Rychlé screeningové testy

Rychlé screeningové testy mohou napomoci předběžné diagnóze, ale nejsou dostačující. Použije se jeden nebo více následujících testů:

2.2.1. Test na výtok slizu ze stonku

2.2.2. Test na přítomnost granulí poly-b-hydroxybutyrátu (PHB)

2.2.3. Sérologické aglutinační testy

2.2.4. Jiné testy

Dalšími vhodnými rychlými screeningovými testy jsou test IF, test FISH, testy ELISA a testy PCR.

2.3. Postup při izolaci

Odebere se sliz nebo vrstva zbarveného pletiva z cévního prstence hlízy bramboru nebo z cévních vláken stonku rostliny bramboru, rajčete nebo jiné vadnoucí hostitelské rostliny. Suspenduje se, připraví se řada desetinásobných ředění suspenze. Přenese se na universální živnou půdu. Rozetře se metodou zřeďovacích roztěrů. Připraví se případně samostatné misky s rozředěnou buněčnou suspenzí *R. solanacearum* biovar 2 k pozitivní kontrole. Inkubuje se 2 - 6 dní při teplotě 28 °C.

2.4 Identifikační testy *Ralstonia solanacearum*

Testy potvrzující výskyt *R. solanacearum* v podezřelých izolátech jsou popsány v bodu 6.2.

3. Detekce a identifikace původce hnědé hniloby ve vzorcích hlíz bramboru

3.1. Podrobné metody pro detekci a identifikaci *Ralstonia solanacearum* ve vzorcích bezpříznakových hlíz bramboru

3.1.1. Příprava vzorků

Poznámka:

- Standardní velikost vzorku je 200 hlíz na jeden test. Intenzivnější vzorkování vyžaduje více testů na vzorcích této velikosti. Větší množství hlíz ve vzorku vede k zpomalení nebo složitějšímu výkladu výsledků. Postup 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.

- Extrakt bramboru může být rovněž použit pro zjištění původce bakteriální kroužkovitosti bramboru *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Nepovinné ošetření před přípravou vzorku

Inkubace vzorků při teplotě 20 - 30 °C po dobu až 2 týdnů před testováním na podporu množení všech populací *R. solanacearum*.

Hlízy se omyjí. Použijí se vhodné desinfekční prostředky (s obsahem chlóru, jestliže má být proveden PCR test, pro odstranění patogenní DNA) a mycí prostředky mezi každým vzorkem. Hlízy se nechají oschnout na vzduchu. Tento postup mytí je vhodný zvláště v případě, když je ve vzorcích příliš zeminy nebo jestliže má být proveden test PCR nebo přímá izolace.

Poznámka:

Všechny (hnijící) hlízy s podezřelými příznaky hnědé hniloby se dají stranou a testují se odděleně.

Pokud jsou při vyříznutí výkrojku zjištěny příznaky podezření na hnědou hnilobu, provede se vizuální vyšetření takové hlízy na řezu hlízy na pupkovém konci. Všechny naříznuté hlízy s podezřelými příznaky se uchovávají po dobu nejméně 2 dnů při pokojové teplotě, aby mohlo dojít ke zkorkovatění (suberizaci) a potom se uchovávají v chladu (4 - 10 °C) za řádných karanténních podmínek. Všechny hlízy včetně hlíz s podezřelými příznaky by měly být uchovány.

Je-li nutná přeprava extraktu, zajistí se přeprava v chladícím boxu s doručením do 24 až 48 hodin.

 Je nezbytně nutné, aby všechny pozitivní kontroly a vzorky *R. solanacearum* byly uchovány a zpracovány odděleně, aby se zabránilo vzájemné kontaminaci. To platí pro sklíčka IF a všechny testy.

3.1.2. Testování

Postupové diagramy a popisy testů a optimalizovaných protokolů jsou v příslušných dodatcích:

Selektivní izolace (viz. oddíl 6.1.4.)

IF test (viz.oddíl 6.1.5.)

Testy PCR (viz. oddíl 6.1.6.)

Test FISH (viz. oddíl 6.1.7.)

Testy ELISA (viz. oddíl 6.1.8.)

Biotest (viz. oddíl 6.1.9.)

3.2. Podrobné metody pro detekci a identifikaci R. solanacearum ve vzorcích bezpříznakových rostlin bramboru, rajčete nebo jiných hostitelských rostlin

3.2.1. Příprava vzorků

Poznámka:

Pro účely detekce latentních populací *R. solanacearum* se doporučuje testovat smíšené vzorky. Postup lze vhodně použít na smíšené vzorky o počtu až 200 stonkových částí. Provádí-li se průzkum, měl by být založen na statisticky reprezentativním vzorku zkoumané rostlinné populace.

Při vzorkování určité oblasti se doporučuje testovat statisticky representativní vzorek o počtu nejméně 10 rostlin na 1 vzorkovací místo pro každou potenciální plevelnou hostitelskou rostlinu. Detekce patogenu bude nejspolehlivější v období pozdního jara, léta a podzimu, ačkoli přirozenou infekci je možné zjistit po celý rok u víceleté *Solanum dulcamara* rostoucí ve vodních tocích. Mezi známé hostitelské rostliny patří plevelné rostliny bramboru, *Solanum dulcamara, S. nigrum, Datura stramonium* a další zástupci čeledi *Solanaceae*. Dalšími hostitelskými rostlinami jsou rostliny rodu *Pelargonium* spp. a *Portulaca oleracea*. Některé evropské plevelné druhy, které mohou hostit populace *R. solanacearum* biovar 2/Race 3 v kořenech a/nebo oddencích za specifických podmínek, zahrnují *Atriplex hastata, Bidens pilosa, Bidens tripartita, Cerastium glomeratum, Chenopodium album, Eupatorium cannabinum, Galinsoga parviflora, Ranunculus scleratus, Rorippa* spp., *Rumex* spp., *Silene alba, S. nutans, Tussilago farfarra* a *Urtica dioica*.

3.2.2. Testování

Postupové diagramy a popisy testů a optimalizovaných protokolů jsou v příslušných dodatcích:

Selektivní izolace (viz. oddíl 6.1.4.)

Test IF (viz. oddíl 6.1.5.)

Testy PCR (viz. oddíl 6.1.6.)

Test FISH (viz. oddíl 6.1.7.)

Testy ELISA (viz. oddíl 6.1.8.)

Biotest (viz. oddíl 6.1.9.)

4. Detekce a identifikace původce bakteriální hnědé hniloby ve vodě

4.1 Postupový diagram pro detekci a identifikaci *R. solanacearum* ve vodě

Obrázek - Postupový diagram 4.1.



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

1) Viz. oddíl 4.2.1., kde jsou uvedeny doporučené postupy vzorkování.

2) Metody koncentrace patogenu jsou popsány v oddíle 4.2.1. Koncentrace zvětšuje populaci jak patogenu, tak konkurenčních saprofytických bakterií a doporučuje se jen tehdy, jestliže nebrání izolačnímu testu.

3) Selektivní izolační test je popsán v oddíle 6.1.4.

4) Biotest je popsán v oddíle 6.1.9.

5) Metody obohacovacího testu PCR jsou popsány v oddíle 6.1.4.2. a 6.1.6.

6) Metody obohacovacího testu ELISA jsou popsány v oddíle 6.1.4.2. a 6.1.8.

7) Typická morfologie kolonie je popsána v oddíle 2.3.d.

8) Kultivace může selhat z důvodu konkurence nebo inhibice saprofytickými bakteriemi. Je-li podezření, že velká saprofytická populace ovlivní spolehlivost izolace, opakují se izolační testy po zředění vzorku sterilní vodou.

9) Spolehlivá identifikace podezřelých čistých kultur *R. solanacearum* se dosáhne pomocí testů popsaných v oddíle 6.2.

10) Test patogenity je popsán v oddíle 6.3.

4.2. Metody detekce a identifikace *R. solanacearum* ve vodě

Princip

Validované schéma detekce popsané v tomto oddíle je použitelné k detekci patogenu ve vzorcích povrchové vody a rovněž může být použito k testování vzorků odpadní vody ze zpracování brambor a odpadní vody. Očekávaná citlivost detekce se však liší v závislosti na substrátu. Citlivost testu selektivní izolace je ovlivňována populacemi konkurenčních saprofytických bakterií, kterých je obecně mnohem více v odpadní vodě ze zpracování brambor a odpadní vodě než v povrchové vodě. Zatímco níže uvedené schéma předpokládá detekci asi 103 buněk/litr povrchové vody, citlivost detekce v odpadní vodě ze zpracování brambor a odpadní vodě bude pravděpodobně podstatně nižší. Z tohoto důvodu se doporučuje testovat odpadní vodu po provedení nějakého čistícího postupu (např. sedimentace nebo filtrace), při nichž dojde ke snížení saprofytických bakteriálních populací. Omezení citlivosti testovacího schématu by mělo být bráno v úvahu při hodnocení spolehlivosti v případě získání negativních výsledků. Vzhledem k tomu, že se toto schéma používá úspěšně k mapování výskytu nebo nepřítomnosti patogenu v povrchové vodě, je třeba si uvědomit jeho omezení při použití k podobnému mapování v odpadní vodě ze zpracování brambor a v odpadní vodě.

4.2.1. Příprava vzorků

Poznámka:

- Zjištění *R. solanacearum* v povrchové vodě je nejspolehlivější v období pozdního jara, léta a podzimu, kdy teplota vody překračuje 15 °C.

- Opakované vzorkování v různé době během výše uvedených období na určených vzorkovacích místech zvýší spolehlivost zjištění snížením vlivů výkyvů povětrnostních podmínek.

- Vlivem silných dešťů a geografie vodního toku může dojít ke značnému zředění a tím i zastření výskytu patogenu.

- Vzorky vody se odebírají v blízkosti hostitelských rostlin, pokud jsou přítomny.

4.2.1.1. Na vybraných vzorkovacích místech se odeberou vzorky vody do sterilních zkumavek nebo lahviček na jedno použití, pokud možno 30 cm pod hladinou a 2 m od břehu. Při vzorkování odpadní vody ze zpracování brambor a odpadní vody se odeberou vzorky z místa výtoku odpadní vody. Doporučená velikost vzorku je 500 ml. Je-li upřednostňována menší velikost, doporučuje se odebrat vzorky nejméně 3krát pro každé vzorkovací místo, z nichž každý bude obsahovat 2 opakované dílčí vzorky o velikosti nejméně 30 ml. Při intenzivním mapování se vyberou nejméně 3 vzorkovací místa na každé 3 km vodního toku a vzorkují se rovněž přítoky.

4.2.1.2. Vzorky se přepravují v chladu a temnu (4 - 10 °C) a testují do 24 hodin.

4.2.2. Testování

Viz postupový diagram a popis testů v příslušných dodatcích.

5. Detekce a identifikace původce bakteriální hnědé hniloby v půdě

5.1. Postupový diagram pro detekci a identifikaci *R. solanacearum* v půdě

Obrázek - Postupový diagram 5.1.



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

1) Viz. oddíl 5.2.1., kde jsou uvedeny doporučené postupy vzorkování

2) Selektivní izolační test je popsán v oddíle 6.1.4.

3) Obohacovací PCR testy jsou popsány v oddíle 6.1.4.2. a 6.1.6.

4) Biotest je popsán v oddíle 6.1.9.

5) Typická morfologie kolonie je popsána v oddíle 2.3.d.

6) Kultivace může selhat z důvodů konkurence nebo inhibice saprofytickými bakteriemi. Je-li podezření na vliv saprofytické populace na spolehlivost izolace, opakují se testy selektivní izolace po dalším zředění vzorku.

7) Spolehlivá identifikace podezřelých čistých kultur *R. solanacearum* se dosáhne pomocí testů popsaných v oddíle 6.2.

8) Test patogenity je popsán v oddíle 6.3.

5.2. Metody pro detekci a identifikaci *R. solanacearum* v půdě

Principy

Platné detekční schéma popsané v tomto oddíle je použitelné pro detekci patogenu ve vzorcích půdy, ale může být rovněž použito k testování vzorků pevného odpadu při zpracování brambor nebo kalu z odpadní vody. Je však nutné poznamenat, že tyto metody nejsou dostatečně citlivé, aby zaručovaly detekci nízkých nebo nepravidelně rozptýlených populací *Ralstonia solanacearum*, které se mohou vyskytovat v přirozeně infikovaných vzorcích těchto substrátů.

Při hodnocení spolehlivosti všech získaných negativních výsledků a také při sestavování přehledů určujících přítomnost patogenu v půdě nebo kalu je třeba vzít v úvahu omezenou citlivost tohoto testovacího schématu. Nejspolehlivějším testem přítomnosti patogenu v polní půdě je vypěstování náchylné hostitelské rostliny a její sledování, zda není infikována, ale i při použití této metody unikne nízký stupeň zamoření pozornosti.

5.2.1. Příprava vzorků

5.2.1.1. Vzorkování polní půdy by se mělo řídit standardními principy používanými pro vzorkování hlístů. Na jeden vzorek se shromáždí 0,5 až 1 kg půdy ze 60 míst na ploše 0,3 ha z hloubky 10 - 20 cm. Je-li podezření na výskyt patogenu, zvýší se počet sběrných míst na 120 z plochy 0,3 ha. Před testováním se uchovávají vzorky při teplotě 12 - 15 °C. Kal ze zpracování brambor a kanalizace se navzorkuje shromážděním celkem 1 kg z míst reprezentujících celkový objem testovaného kalu. Před testováním se každý vzorek dobře promíchá.

5.2.2. Testování

Postupový diagram a popis testů jsou v příslušném dodatku.

6. Optimalizované protokoly pro detekci a identifikaci karanténní bakterie *R. solanacearum*

6.1. Diagnostické a detekční testy

6.1.1. Test na výtok slizu ze stonku

Přítomnost *R. solanacearum* ve stoncích vadnoucích rostlin bramboru, rajčete nebo jiných hostitelských rostlin může ukázat následující jednoduchý test pravděpodobného výskytu: uřízne se stonek právě nad úrovní země. Řez stonku se ponoří do zkumavky s čistou vodou. Sleduje, se, zda se po několika minutách objeví charakteristická samovolně proudící vlákna bakteriálního slizu z přeříznutých cévních svazků.

6.1.2. Test na přítomnost granulí poly-b-hydroxybutyrátu

6.1.3. Sérologické aglutinační testy

6.1.4. Selektivní izolace

6.1.4.1. Očkování na živnou půdu

Poznámka:

Než se použije tato metoda poprvé, provede se předběžný test k zajištění reprodukovatelné detekce

103 až 104 jednotek tvořících kolonie *R. solanacearum* na 1 ml přidaných do extraktů ze vzorků, které byly předtím testovány s negativním výsledkem.

Použije se řádně validovaná selektivní živná půda, např. SMSA.

Rozlišení *R. solanacearum* od jiných bakterií schopných na živné půdě růst vyžaduje velkou pozornost. Dále, kolonie *R. solanacearum* mohou mít atypickou morfologii, jestliže Petriho misky jsou přeplněny nebo jsou rovněž přítomny antagonistické bakterie. Je-li podezření na konkurenci nebo inhibici, měl by být vzorek otestován znovu pomocí jiného testu.

Při použití čerstvě připravených extraktů ze vzorků lez očekávat, že citlivost detekce touto metodou bude velmi vysoká. Metoda je však použitelná i pro extrakty, které byly uchovány v glycerolu při teplotě od -68 do -86 °C.

Pozitivní kontroly se připraví jako desetinné ředění ze suspenze 106 cfu/ml virulentního kmene biovaru 2 *R. solanacearum* (např. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857). K vyloučení možné kontaminace se připraví pozitivní kontrolní vzorky zcela odděleně od vzorků k testování.

U každé nově připravené šarže selektivní živné půdy by měla být před jejím použitím k rutinnímu testování vzorků nejdříve otestována její vhodnost pro kultivaci patogenu. Kontrolní materiál se testuje týmž způsobem jako vzorek (vzorky).

Test očkování na selektivní média je negativní, jestliže po 6 dnech nejsou zpozorovány žádné bakterie nebo nejsou nalezeny žádné podezřelé kolonie typické pro *R. solanacearum*, za předpokladu, že nedošlo k inhibici jinými bakteriemi a v kontrolních vzorcích jsou nalezeny typické kolonie *R. solanacearum.*

Test očkování na selektivní média je pozitivní, jestliže jsou izolovány podezřelé kolonie *R. solanacearum.*

6.1.4.2. Obohacovací testy

Použije se validované médium pro obohacení, např. modifikovaný bujón Wilbrink.

Tento postup lze použít pro selektivní zvětšení populací *R. solanacearum* v extraktech ze vzorků a zvýšení citlivosti detekce. Tímto způsobem dojde i ke zředění potenciálních inhibitorů PCR testu (1:100). Obohacení *R. solanacearum* však může být neúspěšné z důvodů konkurence nebo antagonismu saprofytických organismů, které bývají často současně také obohaceny. Z tohoto důvodu může být izolace *R. solanacearum* z obohacené kultury obtížná. Kromě toho, protože může dojít k rozvoji populací sérologicky příbuzných saprofytů, se pro test ELISA doporučuje použít místo polyklonálních protilátek specifické monoklonální protilátky.

Poznámka:

Očekává-li se inhibice obohacení *R. solanacearum* z důvodu vysoké koncentrace konkurenčních saprofytických bakterií, lze docílit lepších výsledků obohacením extraktů ze vzorků před jakýmkoli odstřeďováním nebo jinými postupy zvyšování koncentrace.

6.1.5. Test IF

Postup

Použití testu IF jako hlavního screeningového testu se doporučuje kvůli dokázané spolehlivosti v dosažení požadovaných prahů.

Použije-li se test IF jako hlavní a výsledek IF testu je pozitivní, musí být jako druhý screeningový test použit test izolace, PCR nebo FISH. Jestliže je test IF použit jako druhý screeningový test a je pozitivní, je nutné provést další testování podle postupového diagramu, aby byla analýza úplná.

Poznámka:

Použije se validovaný zdroj protilátek *R. solanacearum*. Doporučuje se určit titr pro každou novou šarži protilátek.

6.1.6. Testy PCR

Principy

Použije-li se test PCR jako hlavní screeningový test a výsledek je pozitivní, musí být povinně proveden druhý screeningový test, a sice izolace nebo IF. Jestliže je PCR použita jako druhý screeningový test a je pozitivní, je nutné provést další testování podle postupového diagramu, aby byla analýza úplná.

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 až 104 buněk *R. solanacearum* na 1 ml přidaný do vzorků extraktů, které byly předtím testovány jako negativní. Dosažení maximální citlivosti a přesnosti ve všech laboratořích může vyžadovat optimalizační pokusy.

Použijí se schválená činidla a protokoly PCR. Pokud možno, zvolí se metoda s interní kontrolou.

Je třeba použít vhodná bezpečnostní opatření k zabránění kontaminace vzorku cílovou DNA. Test PCR by měl být prováděn zkušenými laboranty v laboratořích specializovaných na molekulární biologii, aby se minimalizovala možnost kontaminace cílovou DNA.

S negativními kontrolami (v průběhu extrakce DNA a PCR) by se mělo vždy zacházet jako s konečnými vzorky, aby bylo jasné, jestli došlo k přenosu DNA.

PCR test by měl zahrnovat následující negativní kontroly:

- extraktu ze vzorku, který byl předtím testován na *R. solanacearum* s negativním výsledkem,

- kontroly pufru používaného pro extrakci bakterií a DNA ze vzorku,

- reakční směs PCR.

Měly by být zahrnuty následující pozitivní kontroly:

- alikvotní části resuspendovaných pelet, do kterých byla přidána *R. solanacearum*

- suspenze 106 buněk na 1 ml *R. solanacearum* ve vodě z virulentního izolátu (např. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857;

- pokud možno, při PCR použít také DNA extrahovanou z pozitivních kontrolních vzorků.

Aby se zabránilo případné kontaminaci, připravují se pozitivní kontroly v prostředí odděleném od vzorků, které budou testovány.

Extrakty ze vzorků by měly být pokud možno bez zeminy. V případě použití PCR testu je potřeba připravit extrakty z umytých brambor.

6.1.7. Test FISH

Princip

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

Poznámka:

Používají se schválené oligosondy specifické pro *R. solanacearum*. Úvodní testování touto metodou by mělo umožnit reprodukovatelné zjištění alespoň 103 až 104 buněk *R. solanacearum* na ml přidané do extraktů ze vzorku, které byly předtím testovány s negativním výsledkem.

Následující postup by měl být pokud možno proveden s čerstvě připravenými extrakty, ale je možné jej úspěšně provést s extraktem, který byl uchován v glycerolu při teplotě -16 až -24 °C nebo -68 až -86 °C.

Jako negativní kontrola se použije alikvotní část extraktu ze vzorku, který byl předtím testován na *R. solanacearum* s negativním výsledkem.

6.1.8. Testy ELISA

Princip

Testy ELISA lze použít pouze jako volitelný test kromě testů IF, PCR nebo FISH pro jeho relativně nízkou citlivost. Při použití DAS ELISA je obohacení a použití monoklonálních protilátek povinné. Obohacení vzorků před použitím testu ELISA může zvýšit citlivost testu, ale může se rovněž setkat s nezdarem kvůli konkurenci jiných organismů ve vzorku.

Poznámka:

Použije se validovaný zdroj protilátek *R. solanacearum*. Doporučuje se určení titru pro každou novou šarži protilátek. Titr je definován jako nejvyšší ředění, při kterém dojde k optimální reakci při testování suspense obsahující 105 až 106 buněk na 1 ml homologického kmene *R. solanacearum* a použití vhodných druhotných konjugátů protilátek podle doporučení výrobce. Při testování by měly být použity protilátky v pracovním ředění, které je blízké nebo stejné jako u titru komerční formulace.

Test kontrolního materiálu se provede týmž způsobem jako test vzorku(ů).

Validované jsou dva protokoly ELISA.

a) Nepřímý test ELISA (Robinson Smith et al., 1995)

b) DAS-ELISA

Interpretace výsledků testu ELISA

Test ELISA je negativní, jestliže průměrná hodnota optické hustoty (OH) z jamek se stejnými vzorky je menší než dvojnásobek OH u negativního kontrolního vzorku, pokud všechny hodnoty OH pozitivních kontrolních vzorků jsou větší než 1,0 (po 90 minutách inkubace se substrátem) a jsou větší než dvojnásobek OH získané z negativních vzorkových extraktů.

Test ELISA je pozitivní, jestliže průměrné hodnoty OH z jamek se stejným vzorkem jsou větší než dvojnásobek OH v negativním extraktu testovaného vzorku, pokud hodnoty OH ve všech negativních kontrolních vzorcích jsou menší než dvojnásobek hodnot v pozitivních kontrolních vzorcích.

Negativní hodnoty ELISA v pozitivních kontrolních vzorcích ukazují, že test nebyl proveden správně nebo že byl inhibován. Pozitivní hodnoty ELISA v negativních kontrolních vzorcích ukazují, že došlo k vzájemné kontaminaci nebo nespecifickému vázání protilátek.

6.1.9. Biotest

Poznámka.:

Předběžné testování touto metodou by mělo umožnit reprodukovatelnou detekci 103 až 104  jednotek tvořících kolonie *R. solanacearum* na 1 ml přidaný do extraktu ze vzorku, který byl předtím testován s negativním výsledkem.

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

Interpretace výsledků biotestu

Platné výsledky biotestu jsou získány, jestliže pozitivní kontrolní testovací rostliny vykazují typické příznaky, bakterie mohou být z těchto rostlin znovu izolovány a negativní kontrolní rostliny nevykazují žádné příznaky.

Biotest je negativní, jestliže rostliny nejsou infikovány bakteriemi *R. solanacearum*, pokud byl organismus zjištěn u pozitivních kontrolních testovacích rostlin.

Biotest je pozitivní, jestliže testovací rostliny jsou infikovány bakteriemi *R. solanacearum*.

6.2. Identifikační testy

Identifikují se čisté kultury izolovaného podezřelého organismu *R. solanacearum* použitím nejméně dvou následujících testů založených na různých biologických principech.

Zahrnou se případně známé referenční kmeny pro každý provedený test.

6.2.1. Výživové a enzymatické identifikační testy

Určují se fenotypové vlastnosti, které jsou vesměs přítomny nebo naopak chybí u *R. solanacearum*.

6.2.2. Test IF

6.2.3. Test ELISA

Poznámka:

Při provádění pouze 2 identifikačních testů se nepoužívá kromě této metody jiný sérologický test.

6.2.4. Testy PCR

Identifikace organismu *R. solanacearum* je pozitivní, jestliže amplikony PCR mají stejnou velikost a mají stejnou mnohotvárnost délky fragmentů jako pozitivní kontrolní kmen.

6.2.5. Test FISH

Test FISH je pozitivní, jestliže se u kultury a pozitivní kontroly dosáhne stejných reakcí.

6.2.6. Analýza mastných kyselin (FAP)

 Pěstuje se kultura na tryptikázo-sójovém agaru (Oxoid) 48 hodin při teplotě 28 °C.

 Použijte se metoda FAP (Janse, 1991; Stead, 1992).

Test FAP je pozitivní, jestliže je profil podezřelé kultury stejný jako profil pozitivní kontroly. Výskyt charakteristických mastných kyselin: 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH a 18:1 2OH a absence 16:0 3 OH poukazuje na *Ralstonia* sp.

6.2.7. Metody charakteristiky kmenů

Pro každý nový případ izolace *R. solanacearum* se doporučuje charakteristika kmenu použitím jedné z následujících metod.

U každého provedeného testu se zahrnou případně známé referenční kmeny.

6.2.7.1. Stanovení biovaru

*R. solanacearum* tvoří biovary lišící se schopností využití a/nebo oxidace tří disacharidů a tří hexosových alkoholů.

6.2.7.2. Genomická variabilita

Molekulární identifikace kmenů komplexu R. solanacearum lze dosáhnout několikerými technikami, mezi něž patří:

1. Analýza délkového polymorfismu restrikčních fragmentů RFLP (Cook et al., 1989).

2. Repetitivní sekvenční PCR s využitím primerů REP, BOX a ERIC (Louws et al., 1995; Smith et al., 1995).

3. Analýza délkového polymorfismu amplifikovaných fragmentů AFLP (Van der Wolf et al., 1998).

6.2.7.3. Metody PCR

Specifické primery PCR (Pastrik et al., 2002) lze použít k diferenciaci kmenů patřících do skupiny 1 (biovary 3, 4 a 5) a skupiny 2 (biovary 1, 2A a 2T) *R. solanacearum*, jak bylo původně definováno analýzou RFLP (Cook et al., 1989) a sekvenováním 16S rDNA (Taghavi et al., 1996).

6.3. Konfirmační test (test patogenity)

Jako závěrečné potvrzení diagnózy *R. solanacearum* a k potvrzení virulence kultur identifikovaných jako *R. solanacearum* musí být proveden test patogenity.