

„Príloha č. 1
k nariadeniu vlády č. 70/2004 Z. z.

Časť A

**Testovacia schéma na diagnostiku, určovanie prítomnosti a identifikáciu baktérie,
ktorá spôsobuje baktériovú krúžkovitosť *Clavibacter michiganensis*
(SMITH) DAVIS *et al.* ssp. *sepedonicus* (SPIECKERMANN *et* KOTTHOFF) DAVIS *et al.***

ROZSAH TESTOVACEJ SCHÉMY

Predložená schéma uvádza rozličné postupy používané pri

- a) diagnóze baktériovej krúžkovitosti v zemiakových hlúzach a rastlinách zemiaka,
- b) určovaní prítomnosti *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* vo vzorkách zemiakových hlúz a rastlín zemiaka,
- c) identifikácii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

VŠEOBECNÉ ZÁSADY

Optimalizované protokoly pre rôzne metódy, validované činidlá a podrobnosti o príprave materiálu potrebného na testy sú uvedené v dodatkoch tejto prílohy. Zoznam laboratórií, ktoré boli zaradené do optimalizácie a validovania protokolov, sú uvedené v dodatku I tejto prílohy.

Keďže súčasťou protokolov je určovanie prítomnosti karanténneho organizmu a budú obsahovať aj využitie životaschopných kultúr *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* ako kontrolného materiálu, bude nevyhnutné vykonať postupy na základe náležitých karanténnych podmienok s adekvátnymi zariadeniami na zneškodňovanie odpadu a na základe podmienok náležitých licencií, ktoré vydali príslušné úrady pre karanténu rastlín.

Parametre testovania musia zaručiť jednoznačné a opakovateľné zistenie prítomnosti úrovni *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* na prahoch stanovených pre vybrané metódy.

Presná príprava pozitívnych kontrol je nevyhnutná.

Súčasťou testovania v súlade s požadovanými prahmi je aj správne nastavenie, údržba a kalibrácia zariadenia, starostlivé zaobchádzanie s činidlami a ich uchovávanie, ako aj všetky opatrenia na zabránenie kontaminácii medzi vzorkami, napríklad oddelenie pozitívnych kontrol od testovaných vzoriek. Musia sa uplatňovať normy na kontrolu kvality, aby nedošlo k administratívnym i iným omylom, najmä ak ide o označovanie a dokumentáciu.

Pozitívny výskyt podľa § 3 ods. 3 znamená pozitívny výsledok v diagnostických alebo skriningových testoch, ktoré sa vykonali na vzorke, ako sa uvádza v diagramoch.

Ak je prvý skriningový test (IF alebo PCR/FISH) pozitívny, existuje podozrenie kontaminácie baktériovou krúžkovitosťou a musí sa vykonať druhý skriningový test. Ak je druhý skriningový test pozitívny, podozrenie je potvrdené (podozrivý výskyt) a testovanie podľa schémy musí pokračovať. Ak je druhý skriningový test negatívny, považuje sa vzorka za nekontaminovanú baktériovou krúžkovitosťou.

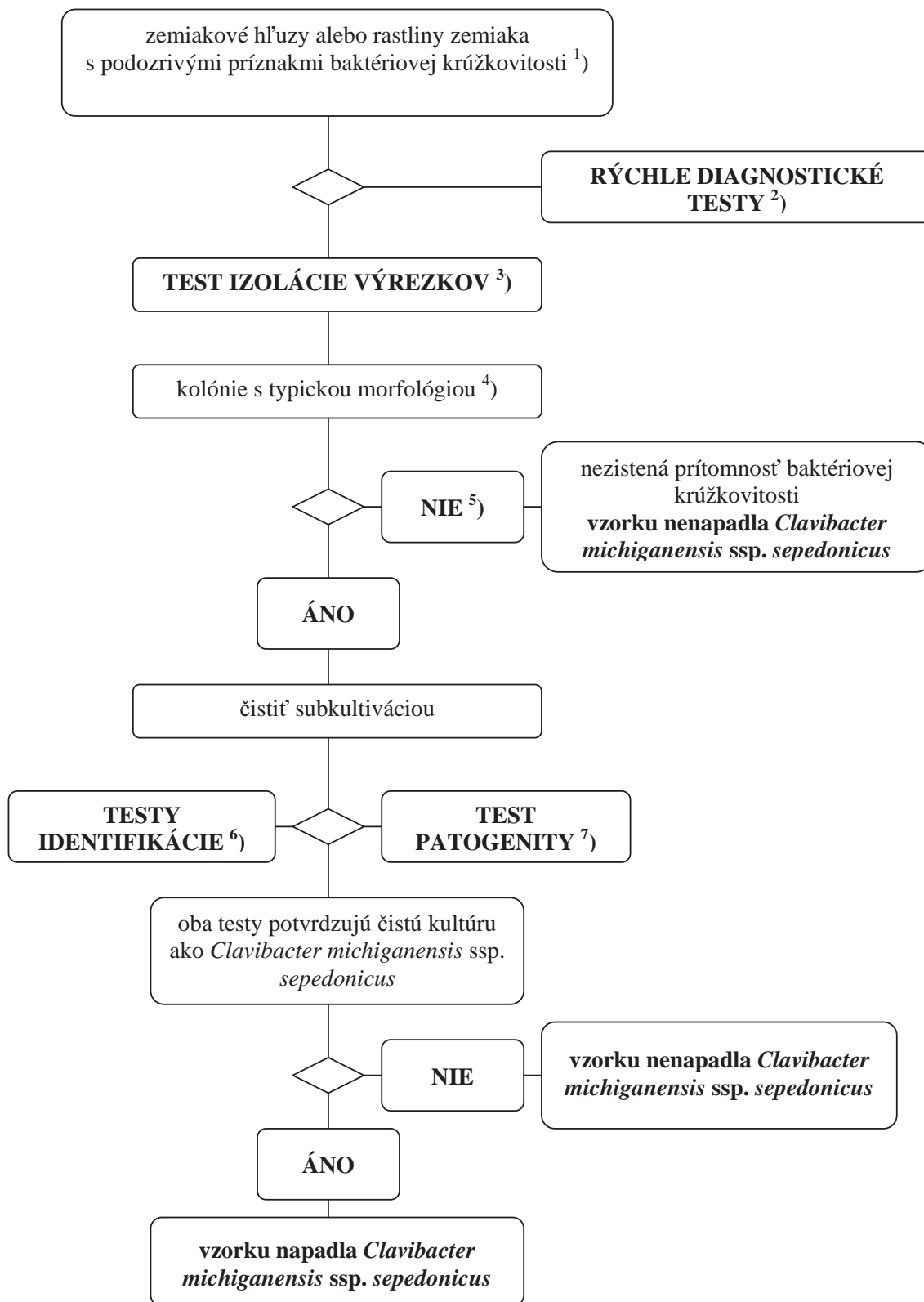
Pozitívna reakcia na IF test podľa § 3 ods. 3 sa definuje ako pozitívna reakcia na IF test, ktorá sa potvrdila v druhom skriningovom teste (PCR/FISH).

Potvrdená prítomnosť podľa § 4 ods. 1 znamená izolovanie a identifikáciu čistej kultúry *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* s potvrdením patogenity.

1. ZNÁZORNENIE VÝVOJOVÝM DIAGRAMOM

1.1. **Schéma určovania prítomnosti na diagnostikovanie baktériovej krúžkovitosti v zemiakových hlúčach a v rastlinách zemiaka s príznakmi baktériovej krúžkovitosti**

Postup testovania sa týka zemiakových hlúč a rastlín zemiaka s typickými alebo podozrivými príznakmi baktériovej krúžkovitosti zemiaka. Patrí sem rýchly skriningový test, izolácia patogénu z infikovaného cievného pletiva na diagnostických médiách a pri pozitívnom výsledku identifikácia kultúry ako *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.



Poznámky:

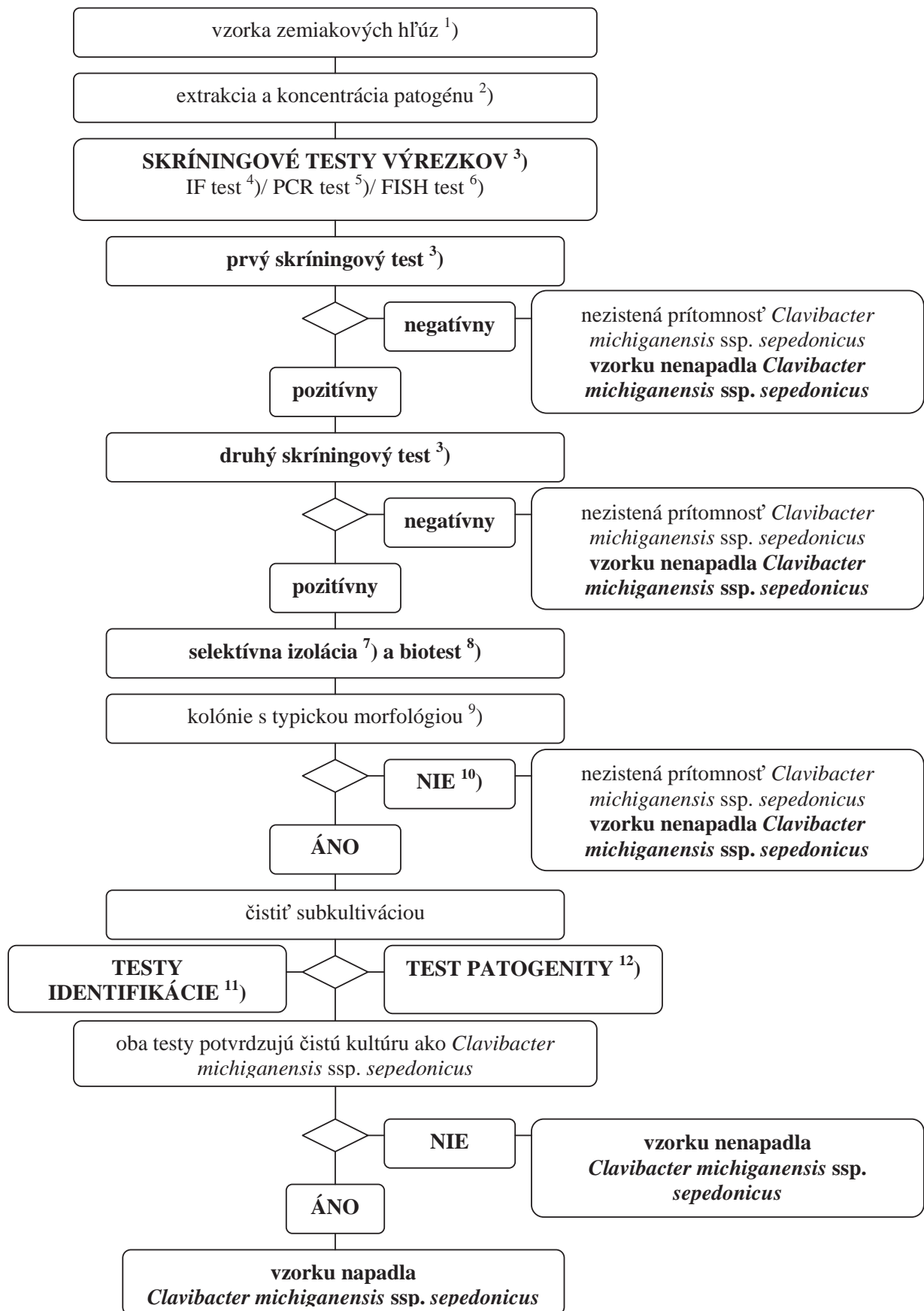
- 1) Opis príznakov sa nachádza v bode 2.
- 2) Vhodné testy sú:
 - IF test (bod 4),
 - test PCR (bod 6),
 - test FISH (bod 5).
- 3) Hoci je izolovanie patogénu riedením a platňovým rozterom z rastlinného materiálu s typickými príznakmi jasné, kultivovanie môže zlyhať v pokročilých fázach infikovania. Saprophytické baktérie rastúce na infikovanom pletive môžu rásť oveľa rýchlejšie ako patogén alebo môžu potlačiť jeho rast na izolačnom médiu. Preto sa odporúča použiť naraz neselektívne aj selektívne médiá, ak možno MTNA (bod 8) alebo biotest (bod 7).
- 4) Opis typickej morfológie kolónie sa uvádza v bode 8.
- 5) Ak je test izolácie negatívny, ale príznaky ochorenia sú typické, musí sa izolácia zopakovať.
- 6) Spoľahlivá identifikácia čistej kultúry baktérievej krúžkovitosti sa dosiahne použitím testov uvedených v bode 9.
- 7) Test patogenity sa uvádza v bode 10.

1.2. Schéma na určenie prítomnosti a identifikáciu baktérievej krúžkovitosti vo vzorkách bezpríznakových zemiakových hlúz

Princíp

Cieľom testovacieho postupu je zistiť prítomnosť skrytých infekcií v zemiakových hlúzach. Pozitívny výsledok najmenej dvoch skriningových testov založených na rôznych biologických princípoch musí dopĺňať izolácia patogénu a následne pri izolácii typických kolónií potvrdenie čistej kultúry ako *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Pozitívny výsledok iba jedného zo skriningových testov nie je dostatočný na to, aby sa vzorka považovala za podozrivú.

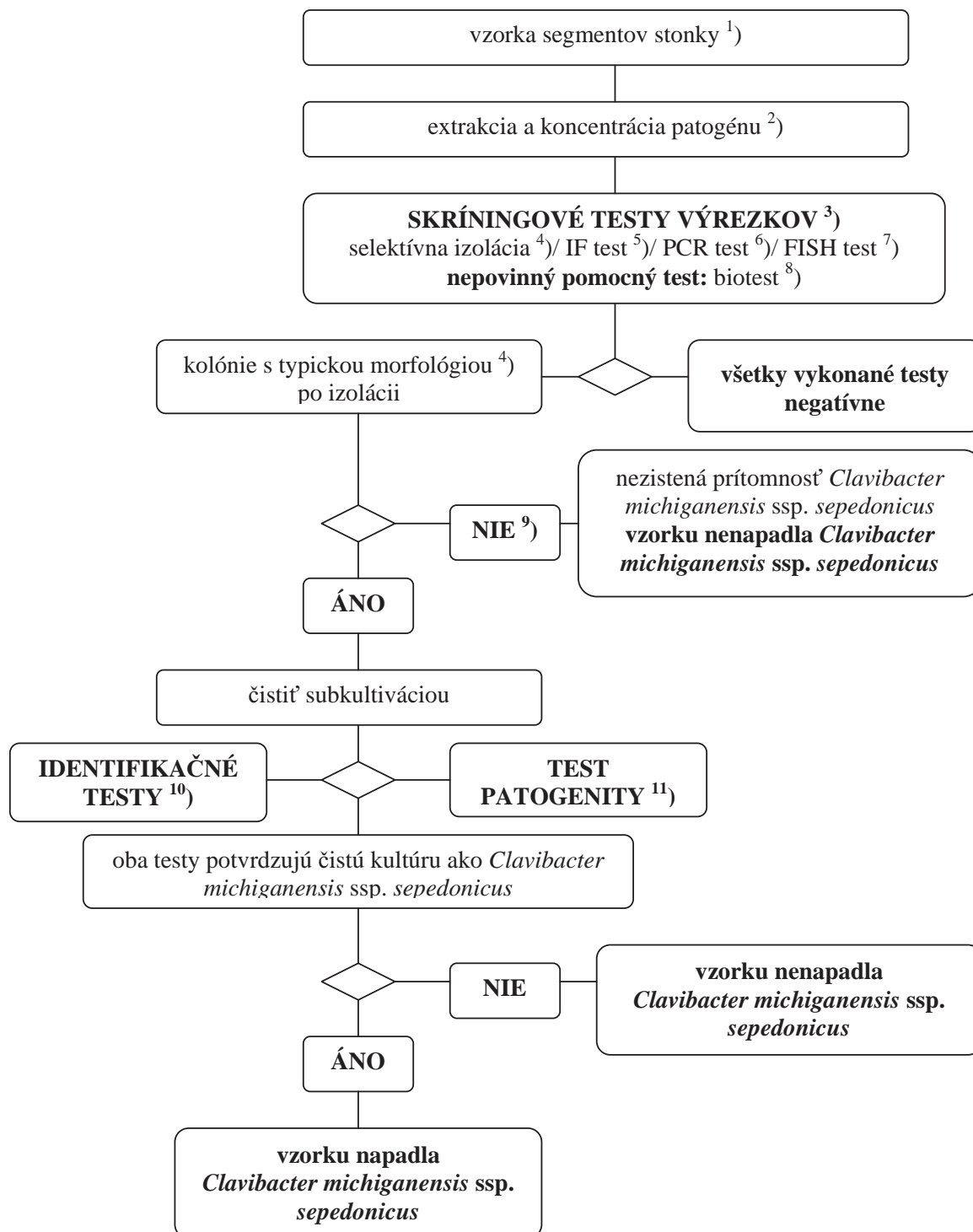
Skriningové testy a izolačné testy musia umožniť prah zistenia prítomnosti 10^3 až 10^4 buniek/ml resuspendovaného peletu, zahrňujúci pozitívne kontroly v každej sérii testov.



Poznámky:

- 1) Štandardná veľkosť vzorky je 200 hľúz, postup sa dá však použiť aj s menšími vzorkami, ak 200 hľúz nie je k dispozícii.
- 2) Extrakcia patogénu a metódy koncentrácie sa uvádzajú v bode 3.1.
- 3) Ak najmenej dva testy založené na biologických princípoch sú pozitívne, musí sa vykonať izolácia a potvrdenie. Vykoná sa najmenej jeden skriningový test. Ak je tento test negatívny, vzorka sa považuje za negatívnu. Ak je test pozitívny, vyžaduje sa druhý alebo ďalšie skriningové testy založené na rôznych biologických princípoch s cieľom overiť prvý pozitívny výsledok. Ak druhý alebo ďalšie testy sú negatívne, vzorka sa považuje za negatívnu. Ďalšie testy nie sú potrebné.
- 4) Imunofluorescenčný (IF) test.
Pre IF skrining sa vždy použije polyklonálna protilátka, s dodatočnými monoklonálnymi protilátkami je možné získať viac špecifickosti (bod 4).
- 5) Test PCR.
Použijú sa náležite validované PCR činidlá a protokoly (bod 6).
- 6) Test FISH.
Použijú sa náležite validované činidlá a protokoly (bod 5).
- 7) Selektívna izolácia.
S médiom MTNA alebo NCP-88 a s použitím riedenia 1/100 resuspendovaného peletu vzorky je to v mnohých prípadoch vhodná metóda pre priamu izoláciu baktérievej krúžkovitosti. Typické kolónie možno získať tri až desať dní po platňovom roztere. Patogén sa dá čistiť a identifikovať. Test si na plné využitie svojho potenciálu vyžaduje starostlivú prípravu výrezkov pupkových koncov hľúz, aby sa predišlo kontaminácii druhotnými baktériami, ktoré sa spájajú so zemiakovou hľuzou a sú konkurenčnými organizmami baktérievej krúžkovitosti na médiu a môžu prerásť patogén. Ak platňový test zlyhá, izolácia sa musí vykonať z rastlín použitých na biotest (bod 8).
- 8) Biotest sa používa na izoláciu baktérievej krúžkovitosti z peletov zo zemiakového extraktu selektívnym obohatením v rastlinách baklažánu (*Solanum melongena*). Test si vyžaduje optimálne inkubačné podmienky tak, ako sú uvedené v rámci tejto metódy. Baktérie inhibujúce baktérievu krúžkovitosť na médiu MTNA alebo NCP-88 do tohto testu najpravdepodobnejšie zasahovať nebudú (bod 7).
- 9) Typická morfológia kolónie sa uvádza v bode 8.
- 10) Kultivovanie alebo biotesty môžu zlyhať z dôvodu konkurencie alebo inhibície saprofytickými baktériami. Ak sa v skriningových testoch dosiahnu pozitívne výsledky, ale izolačné testy sú negatívne, zopakujú sa izolačné testy z toho istého peletu alebo odobratím dodatočného cievného pletiva pri pupkovom konci z rozrezaných hľúz z tej istej vzorky, a ak je to potrebné, testujú sa dodatočné vzorky.
- 11) Spoľahlivá identifikácia čistých predpokladaných kultúr baktérievej krúžkovitosti sa dosiahne použitím testov opísaných v bode 9.
- 12) Test patogenity sa uvádza v bode 10.

1.3. Schéma na určovanie prítomnosti a identifikáciu baktériovej krúžkovitosti vo vzorkách bezpriznakových rastlín zemiaka



Poznámky:

- 1) Bod 3.2 pre odporúčanú veľkosť vzorky.
- 2) Extrakcia patogénu a metódy koncentrácie sa uvádzajú v bode 3.2.
- 3) Ak najmenej dva testy založené na rôznych biologických princípoch sú pozitívne, musí sa vykonať izolácia a potvrdenie. Vykoná sa najmenej jeden skriningový test. Ak je tento test negatívny, vzorka sa považuje za negatívnu. Ak je tento test pozitívny, vyžaduje sa druhý alebo ďalšie skriningové testy založené na rôznych biologických princípoch s cieľom overiť prvý pozitívny výsledok. Ak druhý alebo ďalšie testy sú negatívne, vzorka sa považuje za negatívnu. Ďalšie testy nie sú potrebné.
- 4) Test selektívnej izolácie a typická morfológia kolónie sa uvádzajú v bode 8.
- 5) IF test sa uvádza v bode 4.
- 6) Testy PCR sa uvádzajú v bode 6.
- 7) Test FISH sa uvádza v bode 5.
- 8) Biotest sa uvádza v bode 7.
- 9) Kultivácia alebo biotesty môžu zlyhať z dôvodu konkurencie alebo inhibície saprofytickými baktériami. Ak sa v skriningových testoch dosiahnu pozitívne výsledky, ale izolačné testy sú negatívne, zopakujú sa izolačné testy, a ak je to potrebné, testujú sa dodatočné vzorky.
- 10) Spoľahlivá identifikácia čistých predpokladaných kultúr baktérievej krúžkovitosti sa dosiahne použitím testov opísaných v bode 9.
- 11) Test patogenity sa uvádza v bode 10.

2. VIZUÁLNE HODNOTENIE PRÍZNAKOV BAKTÉRIOVEJ KRÚŽKOVITOSTI ZEMIAKA

2.1. Rastliny zemiaka

Príznaky baktériovej krúžkovitosti zemiaka môžu byť zameniteľné s príznakmi iných chorôb, starnutia alebo mechanického poškodenia. Vädnutie je spravidla pomalé a spočiatku sa obmedzuje na okraje listov. Mladé infikované listy sa často naďalej vyvíjajú, ale na infikovaných miestach menej výrazne. Listy tak nadobúdajú nepravidelný tvar. Listy postihnuté blokovaním cievnych zväzkov stonky, nachádzajúce sa nižšie na stonke, majú chlorotické, žlté až oranžové interkostálne oblasti. Infikované listy a dokonca stonky môžu odumrieť. Listy a hľuzy často len zmenia svoju veľkosť. Príležitostne sa vývin rastlín zastaví.

2.2. Zemiakové hľuzy

Prvými príznakmi sú jemná sklovitosť alebo priesvitnosť pletiva bez zmäknutého okolia cievneho systému, osobitne v blízkosti pupkových koncov. Sfarbenie prstenca cievnych zväzkov na pupkovom konci môže byť oproti normálnemu stavu mierne tmavšie. Prvými ľahko identifikovateľnými príznakmi sú žltkasté sfarbenie prstenca cievnych zväzkov a vytekajúce stĺpčekovité látky syrovitej konzistencie z ciev pri jemnom stlačení hľuzy. Tento výlučok obsahuje milióny baktérií. V tomto štádiu sa môže objaviť hnednutie cievneho pletiva. Tieto príznaky sa najprv môžu obmedzovať na jednu časť prstenca, nemusí to však byť nevyhnutne pri pupkových koncoch, a postupne sa môžu rozširovať na celý prstenec. S postupujúcou infekciou dochádza k rozkladu cievnych pletív, vonkajšia vrstva zásobného pletiva sa môže oddeľovať od vnútornej vrstvy. V pokročilých štádiách infekcie sa na povrchu hľúz objavujú priehlbiny, ktoré majú často červeno-hnedé sfarbenie okrajov. Druhotné napadnutie hľúz hubami alebo baktériami môže tieto príznaky prekryť a rozlíšenie pokročilejších štádií tohto ochorenia od ostatných hnilobných ochorení sa môže sťažiť.

3. PRÍPRAVA VZORIEK

3.1. Zemiakové hľuzy

- Štandardná veľkosť vzorky je 200 hľúz na každý test. Intenzívnejší odber vzoriek znamená viac testov na vzorkách tejto veľkosti. Väčšie počty hľúz vo vzorke povedú k inhibícii alebo zložitej interpretácii výsledkov. Postup sa však môže bez ťažkostí uplatniť aj na vzorky s menej ako 200 hľuzami, keď je k dispozícii menej hľúz.
- Overenie všetkých metód na určovanie prítomnosti opísaných nižšie sa zakladá na testovaní vzoriek 200 hľúz.
- Extrakt zemiaka, ktorý sa uvádza nižšie, sa môže použiť aj na určovanie prítomnosti hnedej hniloby zemiaka (*Ralstonia solanacearum*).

Nepovinné predbežné spracovanie, ktoré predchádza príprave vzorky:

Pri čistení hľúz sa použije vhodný dezinfekčný prostriedok (zlúčeniny chlóru, ak sa má použiť test PCR s cieľom odstrániť prípadnú patogénnu DNA) a čistiaci prostriedok medzi každou vzorkou. Hľuzy sa nechajú na vzduchu vyschnúť. Tento čistiaci postup je užitočný (nie je však povinný) predovšetkým pre vzorky s nadbytočným obsahom pôdy a tiež vtedy, keď sa má vykonať test PCR alebo priama izolácia.

3.1.1. Čistým a dezinfikovaným skalpelom alebo nožom na zeleninu sa odstráni šupka hľuzy na jej pupkovom konci, aby bolo vidieť cievne pletivo. Z cievneho pletiva na pupkovom konci každej hľuzy sa opatrne vyreže malý kúsok, pritom je potrebné dbať na to, aby sa vyrezalo čo najmenej necievneho pletiva.

Akékoľvek hľuzy s podozrivými príznakmi baktériovej krúžkovitosti sa odložia a testujú sa oddelene.

Ak sa počas odoberania na pupkovom konci hľuzy objavia podozrivé príznaky baktériovej krúžkovitosti, mala by sa vykonať vizuálna prehliadka tejto hľuzy po narezaní pri pupkovom konci. Všetky odrezané hľuzy s podozrivými príznakmi by sa mali suberizovať (zahojenie reznej rany) najmenej dva dni pri izbovej teplote a potom uskladniť v chlade v karanténnych podmienkach (pri teplote 4 až 10 °C), pokiaľ sa neskončia všetky testy. Všetky hľuzy vo vzorke (vrátane hľúz s podozrivými príznakmi) by sa mali uchovávať podľa časti B.

3.1.2. Výrezky pupkových koncov hľúz sa umiestnia do nepoužitých jednorazových nádob, ktoré sa dajú uzavrieť alebo utiesniť (pri opätovnom použití sa nádoby musia dôkladne vyčistiť a dezinfikovať pomocou chlórových zlúčenín). Výrezky pupkových koncov hľúz by sa mali spracovať pokiaľ možno čo najskôr. Ak to nie je možné, skladujú sa v nádobe bez pridania tlmivého roztoku, ochladené nie dlhšie ako 72 hodín alebo pri izbovej teplote nie dlhšie ako 24 hodín. Sušenie a suberizácia (zahojenie reznej rany) výrezkov, ako aj rast saprofytov počas skladovania môžu byť prekážkou pri určovaní prítomnosti baktérie, ktorá spôsobuje baktériovú krúžkovitosť.

3.1.3. Výrezky pupkových koncov hľúz sa spracujú jedným z týchto postupov:

- a) zaliatím sa prekryjú výrezky dostatočným množstvom (približne 40 ml) extrakčného tlmivého roztoku (dodatok 3) a vložia sa do rotačnej trepačky (50 až 100 otáčok za minútu) na štyri hodiny pri laboratórnej teplote nižšej ako 24 °C alebo na 16 až 24 hodín pri 4 až 10 °C alebo
- b) výrezky sa zhomogenizujú s dostatočným množstvom (približne 40 ml) extračného tlmivého roztoku (dodatok 3) buď v mixéri (napr. Waring alebo Ultra Thurax), alebo drvením v utesenom jednorazovom maceračnom vrecúšku (napr. Stomacher alebo Bioreba strong gauge polythene, 150 mm × 250 mm;

sterilizované ožiarením) s použitím gumeného kladivka alebo vhodného drviaceho zariadenia (napr. Homex).

Nebezpečenstvo krížovej kontaminácie vzoriek je vysoké, keď sa vzorky homogenizujú pomocou mixéra. Prijmú sa opatrenia, aby sa predišlo vytváraniu aerosólu alebo preliatiu počas extrakčného procesu. Zabezpečí sa, aby sa pre každú vzorku použili čerstvo sterilizované čepele mixéra a nádoby. Ak sa má použiť test PCR, je potrebné zabrániť akémukoľvek prenosu DNA na nádobách alebo drviacom zariadení. Ak sa má použiť PCR, odporúča sa drvenie v jednorazových vrecúškach a použitie jednorazových skúmaviek.

- 3.1.4. Dekantuje sa supernatant. Ak je nadmerne kalný, prečistí sa buď nízkou rýchlosťou odstredovania (pri odstredivej sile nie väčšej ako 180 g počas desiatich minút pri teplote medzi 4 až 10 °C), alebo vákuovou filtráciou (40 až 100 µm), filter sa premyje dodatočným (~10 ml) extrakčným tlmivým roztokom (dodatok 3).
- 3.1.5. Skoncentruje sa bakteriálna frakcia odstredovaním pri odstredivej sile 7 000 g počas 15 minút (alebo 10 000 g počas 10 minút) pri teplote medzi 4 až 10 °C a supernatant sa vyleje tak, aby sa neporušil vzniknutý pelet.
- 3.1.6. Pelet sa resuspenduje v 1,5 ml peletového tlmivého roztoku (dodatok 3). Použije sa 500 µl na test pre *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, 500 µl na test pre *Ralstonia solanacearum* a 500 µl na archiváciu. Do konečnej koncentrácie 10 až 25 % (objem/objem) sa pridá sterilný glycerín ku každému podielu, pretrepe sa a skladuje pri teplote -16 až -24 °C (niekoľko týždňov) alebo pri teplote -68 až -86 °C (niekoľko mesiacov). Počas testovania sa uchovávajú testované alikvotné podiely pri teplote 4 až 10 °C.

Opakované zmrazovanie a rozmrazovanie sa neodporúča.

Ak sa požaduje preprava extraktu, je nevyhnutné zabezpečiť dodanie v chladiacom boxe v časovom rozpätí 24 až 48 hodín.

- 3.1.7. Je nevyhnutné, aby sa so všetkými pozitívnymi kontrolami a vzorkami *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* zaobchádzalo oddelene, aby nedošlo ku kontaminácii. Platí to pre podložné sklička pre IF test a pre všetky testy.

3.2. Rastliny zemiaka

Na určenie prítomnosti skrytých populácií *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* sa odporúča testovať kompozitné vzorky. Postup sa môže bez ťažkostí uplatniť na kompozitné vzorky až do množstva 200 častí stonky. (Keď sa uskutočňujú prieskumy, mali by sa zakladať na štatisticky reprezentatívnej vzorke skúmanej rastlinnej populácie.)

- 3.2.1. Čistým dezinfikovaným nožom alebo záhradníckymi nožnicami sa odoberú 1 až 2 cm segmenty zo spodnej časti každej stonky, tesne nad úrovňou pôdy.

Segmenty stonky sa krátko dezinfikujú 70 % etanolom a okamžite sa usušia na hodvábnom papieri.

Segmenty stonky sa vložia do uzatvorenej sterilnej nádoby v súlade s nasledujúcimi postupmi odobrania vzoriek.

- 3.2.2. Segmenty stonky sa spracujú podľa jedného z týchto postupov:

- a) segmenty sa zalejú dostatočným množstvom (približne 40 ml) extrakčného tlmivého roztoku (dodatok 3) a vložia sa do rotačnej trepačky (50 až 100 otáčok za minútu) na štyri hodiny pri laboratórnej teplote nižšej ako 24 °C alebo na 16 až 24 hodín pri 4 až 10 °C alebo
- b) segmenty sa okamžite spracujú drvením v pevnom maceračnom vrecúšku (napr. Stomacher alebo Bioreba strong guage polythene) s náležitým množstvom extrakčného tlmivého roztoku (dodatok 3) s použitím gumeného kladivka alebo vhodného drviaceho zariadenia (napr. Homex). Ak to nie je možné, uchovávajú sa segmenty stoniek ochladené nie dlhšie ako 72 hodín alebo pri izbovej teplote nie dlhšie ako 24 hodín.

- 3.2.3. Supernatant sa dekantuje po usadzovaní počas 15 minút.

- 3.2.4. Ďalšie čistenie extraktu alebo koncentrácie bakteriálnej frakcie sa spravidla nevyžaduje, ale dá sa dosiahnuť filtráciou alebo odstredovaním podľa bodov 3.1.4 až 3.1.6.

- 3.2.5. Neriedený alebo koncentrovaný extrakt zo vzorky sa rozdelí na dve rovnaké časti. Jedna časť sa uchová počas testovania pri teplote 4 až 10 °C a druhá časť sa uskladní pomocou 10 až 25 % (objem/objem) sterilného glycerínu pri teplote -16 až -24 °C (niekoľko týždňov) alebo pri teplote -68 až -86 °C (niekoľko mesiacov), ak sa vyžaduje ďalšie testovanie.

4. IF TEST

Princíp

Použitie IF testu ako základného skriningového testu sa odporúča kvôli jeho preukázanej schopnosti dosiahnuť požadované prahy.

Keď sa IF test používa ako hlavný skriningový test a jeho výsledok je pozitívny, test PCR alebo test FISH sa musí vykonať ako doplnkový skriningový test. Keď sa IF test používa ako doplnkový skriningový test a jeho výsledok je pozitívny, vyžadujú sa ďalšie testy na doplnenie analýzy v súlade s vývojovým diagramom.

Keď sa používa IF test ako hlavný skriningový test, vždy sa používa polyklonálna protilátka. Pri pozitívnom výsledku IF testu s polyklonálnou protilátkou môžu ďalšie skriningy vzorky s monoklonálnou protilátkou poskytnúť viac špecifickosti, ale môžu byť tiež menej citlivé.

Použijú sa protilátky k referenčnému kmeňu *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Odporúča sa, aby sa titer určil pre každú novú dávku protilátok. Titer sa definuje ako najvyššie riedenie, pri ktorom nastane optimálna reakcia pri testovaní suspenzie obsahujúcej 10^5 až 10^6 buniek na 1 ml homologického kmeňa *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* a s použitím vhodného konjugátu fluorescenčného izotiokyanátu (FITC) podľa odporúčania výrobcu. Surové polyklonálne alebo monoklonálne protilátky by mali mať titer IF najmenej 1 : 2000. Počas testovania by sa protilátky mali používať v pracovnom riedení (riedeniach) blízkom alebo na úrovni titra. Používajú sa overené protilátky.

Test by sa mal vykonať na čerstvo pripravených extraktoch vzoriek. Ak je to potrebné, môže sa úspešne vykonať na extraktoch uskladnených v glyceríne pri teplote -68 až -86 °C. Glycerín sa dá zo vzorky odstrániť pridaním 1 ml peletového tlmivého roztoku (dodatok 4), opätovným odstredovaním počas 15 minút pri odstredivej sile 7 000 g a resuspendácii v rovnakom objeme peletového tlmivého roztoku. Nie je to nevyhnutné, najmä ak sa vzorky upevnia na podložných sklíčkach nahrievaním nad plameňom (bod 4.2).

Pripraví sa osobitné podložné sklíčka s kontrolným homologickým kmeňom alebo s iným referenčným kmeňom *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* v suspenzii zemiakového extraktu podľa dodatku 2 a prípadne v tlmivom roztoku.

Prirodzene infikované pletivo (udržiavané v lyofilizovanej forme alebo zmrazené pri teplote -16 až -24 °C) by sa malo využiť, ak je to možné, na prípravu pozitívnej kontroly na rovnakom podložnom sklíčku.

Ak ide o negatívne kontroly, použijú sa alikvotné podiely extraktu vzorky, ktoré mali pri predchádzajúcom testovaní negatívny výsledok.

Použijú sa viacjamkové podložné sklíčka, podľa možnosti s desiatimi jamkami s minimálnym priemerom 6 mm.

Kontrolný materiál sa testuje rovnakým spôsobom ako vzorky.

4.1. Podložné sklíčka sa pripraví jedným z týchto postupov:

a) Pri peletoch s relatívne malým škrobovým sedimentom:

Odmeraný štandardný objem (15 μ l je postačujúci pre jamku s priemerom 6 mm – pri väčších jamkách je potrebné použiť zodpovedajúci väčší objem) 1/100 riedeného resuspendovaného zemiakového peletu do prvej jamky. Následne sa pipetou nanesie podobný objem nezriedeného peletu (1/1) do zostávajúcich jamiek v rade. Ďalší rad možno použiť ako duplikát alebo pre druhú vzorku, ako je znázornené na obrázku 1.

b) Pre iné pelety:

Pripraví sa decimálne riedenia (1/10 a 1/100) resuspendovaného peletu v peletovom tlmivom roztoku. Odmeraný štandardný objem (15 μ l je postačujúci pre jamku s priemerom 6 mm – pri väčších jamkách je potrebné použiť zodpovedajúci väčší objem) resuspendovaného peletu a z každého riedenia sa nanesú pipetou na rad jamiek. Ďalší rad možno použiť ako duplikát alebo pre druhú vzorku, ako je znázornené na obrázku 2.

4.2. Kvapky sa nechajú vyschnúť pri teplote okolitého prostredia alebo zohriatím na teplotu 40 až 45 °C. Baktériové bunky sa fixujú na podložnom sklíčku buď zahriatím (15 minút pri 60 °C) nad plameňom 95 % etanolu, alebo podľa špecifických pokynov od dodávateľov protilátok.

Ak je to potrebné, možno fixované sklíčka uskladniť zmrazené vo vysušenej schránke, a to, ak je to možné, čo na najkratší čas (maximálne tri mesiace) pred ďalším testovaním.

4.3. Postup pri IF

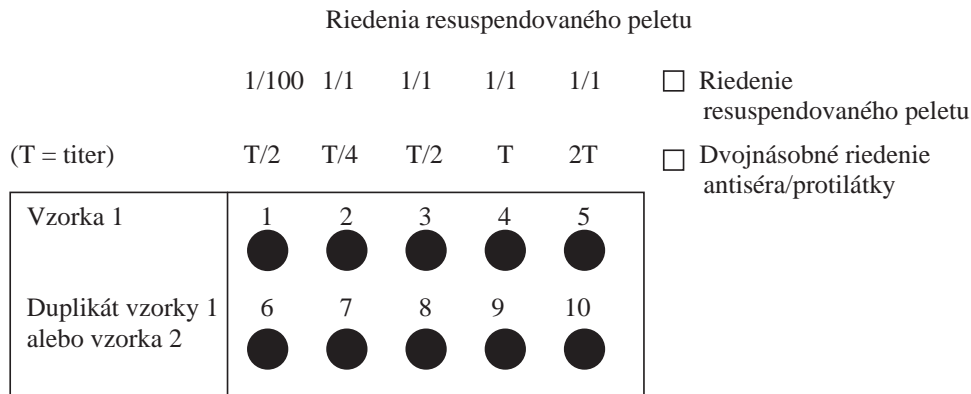
a) Pri príprave podložného sklíčka podľa bodu 4.1 a):

Pripraví sa sada dvojnásobných riedení protilátky v pufrí IF. V prvej jamke by mala byť 1/2 titra (T/2), v ostatných 1/4 titra (T/4), 1/2 titra (T/2), titer (T) a dvojnásobok titra (2T).

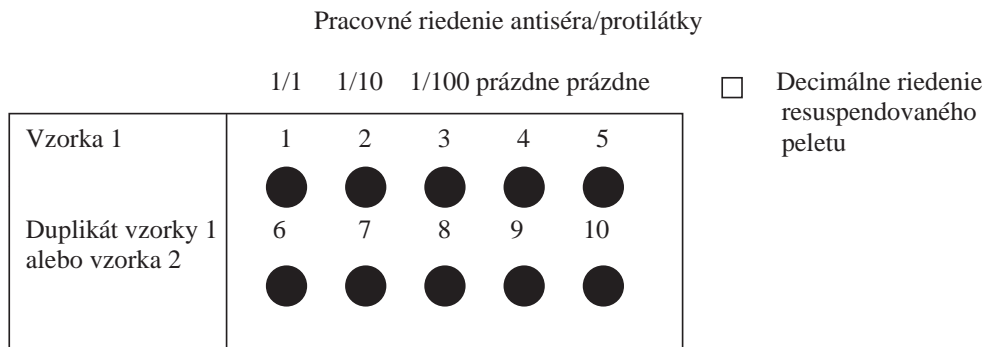
b) Pri príprave podložného sklíčka podľa bodu 4.1 b):

Pripraví sa pracovné riedenie protilátky v tlmivom roztoku IF. Pracovné riedenie ovplyvní špecifickosť.

Obrázok 1: Príprava podložného sklička postupom podľa bodov 4.1 a) a 4.3 a)



Obrázok 2: Príprava podložného sklička podľa bodov 4.1 b) a 4.3 b)



4.3.1. Podložné sklička sa uložia na vlhký papier. Všetky testovacie jamky sa úplne pokryjú riedeniami protilátky. Objem protilátky nanášaný na každú jamku musí prinajmenšom zodpovedať objemu naneseného extraktu.

Nasledujúci postup by sa mal vykonať vtedy, ak dodávatelia protilátok neposkytli špecifické pokyny.

4.3.2. Podložné sklička na vlhkom papieri sa nechajú zakryté počas 30 minút pri teplote okolitého prostredia (18 až 25 °C).

4.3.3. Z každého podložného sklička sa opatrne strasú kvapky a podložné sklička sa opatrne opláchnu tlmivým roztokom IF. Preplachujú sa päť minút v tlmivom roztoku IF-Tween (dodatok 3) a potom päť minút v tlmivom roztoku IF. Je potrebné zabrániť vytváraniu aerosólu alebo prenosu kvapôčok, ktoré by mohli spôsobiť krížovú kontamináciu. Prebytočná vlhkosť sa starostlivo odstráni pijavým papierom.

4.3.4. Podložné sklička sa položia na vlhký papier. Testovacie jamky sa pokryjú riedením konjugátu FITC použitým na stanovenie titra. Objem konjugátu nanášaný na jamky musí zodpovedať objemu aplikovanej protilátky.

4.3.5. Podložné sklička na vlhkom papieri sa nechajú zakryté počas 30 minút pri teplote okolitého prostredia (18 až 25 °C).

4.3.6. Kvapky konjugátu sa opatrne strasú z podložného sklička. Opláchnu sa a prepláchnu rovnako ako v bode 4.3.3.

Prebytočná vlhkosť sa starostlivo odstráni.

4.3.7. Na každú jamku sa napipetuje 5 až 10 µl 0,1 M roztoku glycerínu tlmeneho fosfátom (dodatok 3) alebo komerčná krycia kvapalina na udržanie signálu a priloží sa krycie skličko.

4.4. Hodnotenie testu IF

4.4.1. Podložné sklička sa prezrú pod epifluorescenčným mikroskopom s filtrami vhodnými pre excitáciu FITC, pod olejovou alebo vodnou imerziou pri zväčšení 500 až 1 000. Každé poličko sa mikroskopicky prezrie v dvoch navzájom kolmých priemeroch a tiež po obvode. Pri vzorkách, v ktorých sa nenachádzajú žiadne bunky alebo len malý počet buniek, sa preskúma najmenej 40 mikroskopických polí.

Najprv sa prezrú podložné sklička s pozitívnou kontrolou. Bunky musia jasne fluoreskovať a byť úplne sfarbené pri určenom titri protilátky alebo pracovnom riedení. Test IF (bod 4) sa pri odlišnom sfarbení musí zopakovať.

- 4.4.2. V testovacích jamkách podložných skličok sa pozorujú jasne fluoreskujúce bunky s charakteristickou morfológiou *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Intenzita fluorescencie musí byť rovnaká alebo lepšia ako pozitívny kontrolný kmeň pri rovnakom riedení protilátky. Na bunky s neúplným sfarbením alebo so slabou fluorescenciou sa neprihliada.

Ak existuje akékoľvek podozrenie z kontaminácie, test sa musí zopakovať. Tento prípad môže nastať, ak všetky podložné sklička v šarži vykazujú pozitívne bunky v dôsledku kontaminácie tlmivého roztoku alebo ak sa pozitívne bunky nachádzajú (mimo jamiek podložných skličok) na krycej vrstve podložného sklička.

- 4.4.3. Existuje viacero problémov súvisiacich so špecifickosťou imunofluorescenčného testu. Nežiaduce populácie fluoreskujúcich buniek s atypickou morfológiou a saprofytických baktérií spôsobujúcich krízové reakcie s veľkosťou a morfológiou podobnou baktériovej krúžkovitosti sa pravdepodobne vyskytnú v peletoch výrezkov pupkovitých koncov hľúz a segmentov stoniek.

- 4.4.4. Prihliada sa iba na fluoreskujúce bunky s typickou veľkosťou a morfológiou pri titri alebo pracovnom riedení protilátok podľa bodu 4.3.

- 4.4.5. Vyhodnotenie výsledkov testu IF:

- a) Ak sa nájdú jasne fluoreskujúce bunky s charakteristickou morfológiou, odhadne sa priemerný počet typických buniek na mikroskopické pole a vypočíta sa počet typických buniek na 1 ml resuspendovaného peletu (dodatok 4).

Výsledok testu IF sa hodnotí ako pozitívny pri vzorkách s najmenej 5×10^3 typických buniek na 1 ml resuspendovaného peletu. Vzorka sa považuje za potenciálne kontaminovanú a vyžaduje sa ďalšie testovanie.

- b) Výsledok testu IF sa hodnotí ako negatívny pri vzorkách s menej ako 5×10^3 buniek na 1 ml resuspendovaného peletu a vzorka sa považuje za negatívnu. Ďalšie testovanie sa nevyžaduje.

5. TEST FISH

Princíp

Keď sa test FISH (fluorescenčná hybridizácia in situ) používa ako prvý skríningový test a má pozitívny výsledok, musí sa vykonať test IF ako druhý povinný skríningový test. Keď sa test FISH používa ako druhý skríningový test a má pozitívny výsledok, vyžaduje sa ďalšie testovanie podľa vývojového diagramu na dokončenie diagnostiky.

Použijú sa overené špecifické oligopróby *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (dodatok 7). Predbežné testovanie touto metódou by malo umožniť opakovateľné určenie prítomnosti najmenej 10^3 až 10^4 buniek *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* na 1 ml pridaných do extraktov vzoriek, ktoré boli predtým testované s negatívnym výsledkom.

Nasledujúci postup by sa mal podľa možnosti vykonať na čerstvo pripravenom extrakte vzorky, ale dá sa úspešne vykonať na extrakte vzorky, ktorý bol uchovaný v glyceríne pri teplote -16 až -24 °C alebo -68 až -86 °C.

Ak ide o negatívne kontroly, použijú sa alikvotné podiely extraktu vzorky, ktoré boli predtým testované s negatívnym výsledkom pre *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

Ak ide o pozitívne kontroly, pripraví sa suspenzie s obsahom 10^5 až 10^6 buniek na 1 ml *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (napr. kmeň NCPPB 4053 alebo PD 406) v 0,01 M fosfátového tlmivého roztoku (PB) z 3- až 5-dňovej kultúry (dodatok 2). Osobitne sa pripraví kontrolné podložné sklička s homologickým kmeňom alebo iným referenčným kmeňom *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* v suspenzii zemiakového extraktu podľa dodatku 2.

Použitie eubakteriálnej oligopróby s označením FITC umožňuje kontrolovať proces hybridizácie, pretože sfarbí všetky eubaktérie prítomné vo vzorke.

Kontrolný materiál sa testuje rovnakým spôsobom ako vzorka.

5.1. Fixovanie zemiakového extraktu

Nasledujúci test sa zakladá na Wullings et al. (1998):

- 5.1.1. Pripraví sa fixačný roztok (dodatok 7).

- 5.1.2. Pipetou sa naniesie 100 μ l z každého extraktu vzorky do Eppendorfovej skúmavky a odstreduje sa pri odstredivej sile 7 000 g počas ôsmich minút.

- 5.1.3. Odoberie sa supernatant a rozpustí sa pelet v 500 μ l fixatívu pripraveného < 24 hodín vopred. Pretrepe sa a inkubuje cez noc pri teplote 4 °C.

Ako fixatív možno použiť aj 96 % etanol. V takomto prípade sa pelet opísaný v bode 5.1.2 rozpustí v zmesi pozostávajúcej z 50 μ l 0,01 M PB a 50 μ l 96 % etanolu. Zmieša sa pretrepaním a inkubuje pri teplote 4 °C počas 30 až 60 minút.

- 5.2.10. Držiak podložného sklička sa presunie do umývacieho roztoku 1/2 hybmix a inkubuje sa počas ďalších 15 minút.
- 5.2.11. Podložné sklička sa krátko ponoria do UPW a položia sa na filtračný papier. Prebytočná vlhkosť sa odstráni tak, že povrch sa opatrne pokryje filtračným papierom. Napipetuje sa 5 až 10 ěl roztoku krycej kvapaliny na udržanie signálu (napr. Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA alebo jej ekvivalent) na každú jamku a veľké krycie skličko (24 × 60 mm) sa položí cez celé podložné skličko.

5.3. Hodnotenie testu FISH

- 5.3.1. Podložné sklička sa okamžite preskúmajú mikroskopom prispôsobeným na epifluorescenčnú mikroskopiu pri zväčšení 630 alebo 1 000x pod olejovou imerziou. S filtrom vhodným na fluorescenčný izotiokyanát (FITC) sa eubakteriálne bunky (vrátane väčšiny gram negatívnych buniek) vo vzorke sfarbia na fluorescenčnú zelenú. S použitím filtra pre tetrametylrodamin-5-izotiokyanát, Cy3-sfarbené bunky *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* sa ukážu ako fluorescenčné červené. Morfológia buniek sa porovná s morfológiou pozitívnych kontrol. Bunky musia byť jasne fluoreskujúce a úplne sfarbené. Test FISH (bod 9.4) sa musí zopakovať, ak je sfarbenie odlišné. Každé pole sa mikroskopicky prehliadne vo dvoch navzájom kolmých priemeroch a taktiež po obvode. Pri vzorkách, ktoré neukazujú žiadny alebo ukazujú len malý počet buniek, sa preskúma najmenej 40 mikroskopických polí.
- 5.3.2. V testovacích jamkách podložných skličok sa pozorujú jasne fluoreskujúce bunky s charakteristickou morfológiou *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Intenzita fluorescencie musí byť rovnaká alebo lepšia ako intenzita fluorescencie pozitívneho kontrolného kmeňa. Na bunky s neúplným sfarbením alebo so slabou fluorescenciou sa neprihliada.
- 5.3.3. Ak existuje podozrenie na akúkoľvek kontamináciu, test sa musí zopakovať. Tento prípad môže nastať, keď všetky podložné sklička v dávke ukazujú pozitívne bunky kvôli kontaminácii tlmivého roztoku alebo keď sa zistia pozitívne bunky (mimo jamiek podložných skličok) na krycej vrstve podložného sklička.
- 5.3.4. Existuje viacero problémov súvisiacich so špecifickosťou testu FISH. Môžu sa objaviť nežiaduce populácie fluoreskujúcich buniek s atypickou morfológiou a saprofytické baktérie spôsobujúce krížové reakcie s veľkosťou a morfológiou podobnou *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, je to však menej časté ako v IF teste, v peletoch pupkovitých koncov hlúz a segmentov stoniek.
- 5.3.5. Do úvahy sa berú len fluoreskujúce bunky s typickou veľkosťou a morfológiou (bod 5.3.2).
- 5.3.6. Vyhodnotenie výsledkov testu FISH:
- Platné výsledky testu FISH sa dosiahnu, ak sa nájdu jasnozeleno fluoreskujúce bunky s veľkosťou a morfológiou typickou pre *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* s použitím filtra FITC a jasnočerveno fluoreskujúce bunky s použitím rhodaminového filtra vo všetkých pozitívnych kontrolách, avšak v žiadnej negatívnej kontrole. Ak sa zistia jasno fluoreskujúce bunky s charakteristickou morfológiou, odhadne sa priemerný počet typických buniek na každé mikroskopické pole a vypočíta sa počet typických buniek na 1 ml resuspendovaného peletu (dodatok 4). Vzorky s najmenej 5×10^3 typických buniek na 1 ml resuspendovaného peletu sa považujú za potenciálne kontaminované. Vyžaduje sa ďalšie testovanie. Vzorky s menej ako 5×10^3 typických buniek na 1 ml resuspendovaného peletu sa považujú za negatívne.
 - Test FISH je negatívny, ak sa jasnočerveno fluoreskujúce bunky s veľkosťou a morfológiou typickou pre *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* nenájdu s použitím rhodaminového filtra za predpokladu, že typické jasnočerveno fluoreskujúce bunky sa nájdu v preparátoch pozitívnych kontrol s použitím rhodaminového filtra.

6. TEST PCR

Princípy

Ak sa test PCR (polymerázová reťazová reakcia) používa ako základný skriningový test a má pozitívny výsledok, test IF sa musí vykonať ako druhý povinný skriningový test. Ak sa test PCR používa ako druhý skriningový test a má pozitívny výsledok, vyžaduje sa ďalšie testovanie podľa vývojového diagramu na dokončenie diagnostiky.

Plné využitie tejto metódy ako základného skriningového testu sa odporúča len vtedy, ak sa získala špecializovaná expertíza.

Predbežné testovanie touto metódou by malo umožniť opakovateľné určenie prítomnosti 10^3 až 10^4 buniek *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* na 1 ml, pridaných do extraktov vzoriek, ktoré sa predtým testovali s negatívnym výsledkom. Optimalizačné experimenty sú žiaduce na dosiahnutie maximálnych úrovní citlivosti a špecifickosti vo všetkých laboratóriách.

Používajú sa validované činidlá a protokoly PCR. Podľa možnosti sa vyberie metóda s internou kontrolou.

Prijmú sa potrebné opatrenia s cieľom zabrániť kontaminácii vzorky cieľovou DNA. Test PCR by mali vykonať skúsení odborníci v špecializovaných laboratóriách molekulárnej biológie s cieľom minimalizovať možnosť kontaminácie cieľovou DNA.

S negatívnymi kontrolami (na extrakciu DNA a procedúry PCR) by sa vždy malo zaobchádzať ako s konečnými vzorkami v procedúre, aby bolo zrejmé, či došlo k nejakému prenosu DNA.

Do testu PCR by sa mali zaradiť tieto negatívne kontroly:

- extrakt vzorky, ktorý sa predtým testoval s negatívnym výsledkom pre *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*,
- kontroly tlmivých roztokov používaných na extrakciu baktérie a DNA zo vzorky,
- reakčná zmes určená na PCR.

Mali by sa zaradiť aj tieto pozitívne kontroly:

- alikvotné podiely resuspendovaných peletov, ku ktorým sa pridala *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (dodatok 2),
- suspenzia 10^6 buniek virulentného izolátu *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* na 1 ml redest H_2O (napr. NCPPB 2140 alebo NCPPB 4053),
- ak je to možné, použite aj DNA získanú z pozitívnych vzoriek pri vykonávaní testu PCR.

S cieľom predísť potenciálnej kontaminácii sa pripravujú pozitívne kontroly v prostredí oddelenom od prostredia, v ktorom sú vzorky na testovanie.

Extrakt vzoriek by mali byť zbavené pôdy. V niektorých prípadoch by sa mohlo odporúčať pripraviť extrakcie z umytých zemiakov, ak sa majú použiť protokoly PCR.

6.1. Metódy čistenia DNA

Vzorky pozitívnych a negatívnych kontrol sa použijú podľa opisu uvedeného v predchádzajúcom texte.

Kontrolný materiál sa pripraví rovnakým spôsobom ako vzorky.

Na čistenie cieľovej DNA je k dispozícii celá škála metód komplexných substrátov vzoriek s cieľom odstrániť inhibítory PCR a ďalšie enzymatické reakcie a koncentrovať cieľovú DNA v extrakte vzorky.

Nasledujúca metóda sa optimalizovala na použitie s validovanou metódou PCR, ktorá sa uvádza v dodatku 6.

6.1.a) Metóda podľa Pastrika (2000)

1. Napipetuje sa 220 μ l lyzačného tlmivého roztoku (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) do 1,5 ml Eppendorfovej skúmavky.
2. Pridá sa 100 μ l extraktu vzorky a vloží sa do ohrievacieho bloku alebo vodného kúpeľa s teplotou 95 °C na 10 minút.
3. Skúmavka sa položí na ľad na päť minút.
4. Pridá sa 80 μ l koncentrovaného roztoku lyzozýmu (50 mg lyzozýmu na ml v 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) a inkubuje sa pri teplote 37 °C počas 30 minút.
5. Pridá sa 220 μ l Easy DNA® roztoku A (Invitrogen), dobre sa premieša pretrepaním a inkubuje sa pri teplote 65 °C počas 30 minút.
6. Pridá sa 100 μ l Easy DNA® roztoku B (Invitrogen), riadne sa pretrepe tak, aby zrazenina v skúmavke voľne obiehala a vzorka bola rovnomerne viskózna.
7. Pridá sa 500 μ l chloroformu a pretrepe sa tak, aby sa viskozita znížila a zmes bola homogénna.
8. Odstreďuje sa s odstredivou silou 15 000 g počas 20 minút pri teplote 4 °C, aby sa oddelili fázy a vytvorilo sa rozhranie.
9. Horná fáza sa premiestni do novej Eppendorfovej skúmavky.
10. Pridá sa 1 ml 96 % etanolu (-20 °C), krátko sa pretrepe a inkubuje sa na ľade počas desiatich minút.
11. Odstreďuje sa s odstredivou silou 15 000 g počas 20 minút pri teplote 4 °C a odstráni sa etanol z peletu.
12. Pridá sa 500 μ l 80 % etanolu (-20 °C) a premieša sa obrátením skúmavky.
13. Odstreďuje sa s odstredivou silou 15 000 g počas desiatich minút pri teplote 4 °C, pelet sa uchová a odstráni sa etanol.
14. Pelet sa nechá usušiť na vzduchu alebo vákuovým odsávaním.
15. Pelet sa resuspenduje v 100 μ l sterilnej UPW a nechá sa pri izbovej teplote počas najmenej 20 minút.
16. Uchováva sa pri teplote -20 °C, až kým sa nebude požadovať pre PCR.
17. Akákoľvek biela zrazenina sa odstredí ku dnu a použije sa 5 μ l supernatantu obsahujúceho DNA pre PCR.

6.1.b) Iné metódy

Uplatniť možno aj iné metódy extrakcie DNA (napr. Qiagen DNeasy Plant Kit) pod podmienkou, že sa preukázala ich rovnaká účinnosť v čistení DNA od kontrolných vzoriek obsahujúcich 10^3 až 10^4 patogénnych buniek na 1 ml.

6.2. PCR

- 6.2.1. Pripraví sa testové a kontrolné izoláty DNA pre PCR v súlade s validovaným protokolom (dodatok 6). Pripraví sa jedno decimálne riedenie z extraktu vzorky DNA (1 : 10 v UPW).
- 6.2.2. Pripraví sa vhodná reakčná zmes PCR v prostredí zbavenom akejkoľvek kontaminácie v súlade s uverejneným protokolom (dodatok 6). Validovaný protokol PCR je „multiplex“ PCR reakciou zahrňujúcou internú kontrolu PCR.
- 6.2.3. Pridá sa 5 µl extraktu DNA na 25 µl reakčnej zmesi PCR v sterilných PCR skúmavkách.
- 6.2.4. Vytvorí sa vzorka negatívnej kontroly, ktorá obsahuje iba reakčnú zmes PCR, a namiesto vzorky sa pridá ultračistá voda UPW z rovnakého zdroja, ako sa použila v reakčnej zmesi PCR.
- 6.2.5. Skúmavky sa vložia do toho istého termocykléra, ktorý sa použil v predbežnom testovaní, a spustí sa náležitý optimalizovaný program PCR (dodatok 6).

6.3. Analýza produktu PCR

- 6.3.1. Produkty PCR sa analyzujú pomocou agarózovej gélovej elektroforézy. Nanesie sa aspoň 12 µl reakčnej zmesi s amplifikovanou DNA, zmiešanou s 3 µl nanášacieho tlmivého roztoku (dodatok 6), do 2,0 % (hmotnosť/objem) agarózového gélu a uvedú sa pod napätie s hodnotou 5 až 8 V/cm v tris-octanovom-EDTA (TAE) tlmivom roztoku (dodatok 6). Použije sa príslušný štandard DNA, napr. 100 bp ladder.
- 6.3.2. Na odhalenie fragmentov DNA sa použije sfarbenie etidiumbromidom (0,5 mg/l) počas 30 až 45 minút, pričom sa dodržiavajú náležité opatrenia na zaobchádzanie s týmto mutagénom.
- 6.3.3. Sfarbenie amplifikovaných produktov PCR s očakávanou veľkosťou (dodatok 6) sa pozoruje v géli pod krátkovlnným UV žiarením (napr. $\lambda = 302$ nm) a zaznamenajú sa výsledky.
- 6.3.4. Vo všetkých nových nálezoch/prípadoch sa overí autentickosť produktu PCR vykonaním restriktívnej analýzy zvyšku vzorky amplifikovanej DNA, a to inkubovaním pri optimálnej teplote a počas optimálnej doby s použitím vhodnej restriktívnej endonukleázy a tlmivého roztoku (dodatok 6). Štiepny profil fragmentov sa vyhodnocuje pomocou agarózovej gélovej elektroforézy podľa postupu opísaného vyššie a pozoruje sa charakteristické usporiadanie fragmentov po enzymatickej reakcii pod krátkovlnným UV žiarením a po sfarbení etidiumbromidom a porovná sa so štiepenou a neštiepenou pozitívnou kontrolou.

Vyhodnotenie výsledkov testu PCR:

Test PCR je negatívny, ak sa nezistí prítomnosť špecifického amplikónu PCR *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* s očakávanou veľkosťou v danej vzorke, ale sa zistí vo všetkých vzorkách pozitívnych kontrol (pri testoch „multiplex“ PCR so špecifickými primermi vnútornej kontroly pre rastlinu: druhý produkt PCR s očakávanou veľkosťou sa musí amplifikovať pri danej vzorke).

Test PCR je pozitívny, ak sa zistí prítomnosť špecifického produktu PCR *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* s očakávanou veľkosťou, a ak je to potrebné, s očakávaným usporiadaním po restriktívnej analýze, pod podmienkou, že sa neamplifikuje pri žiadnej z negatívnych kontrol. Spoľahlivé potvrdenie pozitívneho výsledku možno získať aj zopakovaním testu s druhým súborom primerov PCR (bod 9.3).

Je možné mať podozrenie na inhibíciu PCR, ak sa očakávaný produkt PCR získa zo vzorky pozitívnej kontroly s obsahom *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* vo vode, ale negatívne výsledky sa získajú z pozitívnych kontrol s *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* v zemiakovom extrakte. V testoch multiplex PCR s internými kontrolami PCR sa inhibícia reakcie prejavuje, keď sa nedosiahne žiadny z dvoch amplikónov.

Je možné mať podozrenie na kontamináciu, ak sa očakávaný produkt PCR získa pri jednej alebo viacerých negatívnych kontrolách.

7. BIOTEST

Predbežné testovanie s touto metódou by malo umožniť reprodukovateľné zistenie 10^3 až 10^4 kolónotvorných buniek *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* na 1 ml pridaných do vzorkových extraktov, ktoré boli v predchádzajúcich testoch negatívne (dodatok 2).

Najvyššiu citlivosť zistenia možno očakávať, ak sa použije čerstvo pripravený vzorkový extrakt a podmienky na optimálny rast. Metóda sa môže úspešne použiť aj pri extraktoch, ktoré boli uskladnené zamrazením za prítomnosti glycerínu pri teplote od -68 do -86 °C.

Niektoré odrody baklažánu predstavujú výborné selektívne obohacovacie médium pre rast *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, dokonca aj pri neprítomnosti symptómov, a tiež umožňujú výborný potvrdzovací test.

Podmienky rastu by mali byť optimálne, aby sa znížilo nebezpečenstvo chybných negatívnych výsledkov testu.

Podrobnosti o pestovaní rastlín na test sú uvedené v dodatku 8.

- 7.1. Rozdelí sa celý zostávajúci podiel resuspendovaného peletu vzorky z bodu 3.1.6 alebo 3.2.5 medzi rastliny baklažánu pomocou jednej z nižšie uvedených metód (7.3 alebo 7.4). Použijú sa len rastliny v rastovej fáze 2 až 3 pravého listu. Aby sa zabezpečilo úplné využitie resuspendovaného peletu, ako aj účinné naočkovanie, postupy uvedené nižšie si budú vyžadovať 15 až 25 rastlín baklažánov na každú vzorku.
- 7.2. Rastliny baklažánu sa jeden až dva dni pred očkovaním nepolievajú, aby sa znížilo ich vnútorné napätie.
- 7.3. Naočkovanie pozdĺžneho rezu.
 - 7.3.1. Rastlina baklažánu sa uchopí medzi dva prsty a napipetuje sa kvapka (asi 5 až 10 μ l) rozptýleného peletu na stonku medzi kľúčne listy a prvý list.
 - 7.3.2. Skalpelom sa urobí do stonky priečny rez asi 1 cm dlhý, približne do hĺbky 2/3 hrúbky stonky, počnúc od kvapky očkovaného peletu.
 - 7.3.3. Rez sa uzavrie sterilnou vazelínou z injekčnej striekačky.
- 7.4. Naočkovanie injekčnou striekačkou.

Stopky rastlín baklažánu sa naočkujú presne nad kľúčnymi listami pomocou injekčnej striekačky vybavenej hypodermickou ihlou (najmenej 23 G). Vzorka sa rozdelí medzi rastliny baklažánu.
- 7.5. Ako pozitívna kontrola sa naočkuje päť rastlín s tekutou kultúrou s koncentráciou 10^5 až 10^6 buniek na 1 ml známej kultúry *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, a ak je to možné, sa použije aj prirodzene infikované pletivo zemiakovej hľuzy (bod 4) za použitia tej istej očkovacej metódy (7.3 alebo 7.4).
- 7.6. Ako negatívna kontrola sa naočkuje päť rastlín sterilným peletovým tlmivým roztokom za použitia tej istej očkovacej metódy (7.3 alebo 7.4).
- 7.7. Rastliny sa inkubujú v karanténnych zariadeniach počas štyroch týždňov pri teplote 18 až 24 °C. Rastliny sa inkubujú pri dostatočnom svetle a vysokej vlhkosti (70 až 80 %) a zalievajú sa tak, aby nedochádzalo k podmokaniu alebo vädnutiu v dôsledku nedostatku vody. Bunky baktériovej krúžkovitosti odumierajú pri teplotách nad 30 °C a optimálna teplota predstavuje 21 °C. Aby sa zabránilo kontaminácii, inkubujú sa rastliny s pozitívnu a negatívnu kontrolou na jasne oddelených častiach v skleníku alebo v miestnosti na pestovanie, alebo v obmedzenom priestore sa zabezpečí prísne oddelenie medzi jednotlivými postupmi. Ak musia byť rastliny k rôznym vzorkám inkubované v tesnej blízkosti, oddelia sa vhodným spôsobom zamedzujúcim ich priamemu styku. Pri prihnojovaní, zalievaní, kontrole a iných manipuláciách sa musí dávať veľký pozor, aby nedošlo ku vzájomnej kontaminácii. Je potrebné, aby sa skleníky a miestnosti na pestovanie udržiavali chránené pred škodlivým hmyzom, ktorý môže preniesť baktériu zo vzorky na vzorku.
- 7.8. Po týždni sa začnú pravidelne sledovať symptómy. Vypočíta sa počet rastlín, na ktorých sa prejavujú symptómy *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, ktoré spôsobujú vädnutie listov na rastlinách baklažánu, ktoré sa môže začať buď okrajovým, alebo medzižilovým ochabnutím. Zvädnuté pletivá sa najprv sfarbia do tmavozelena alebo sa na nich vytvárajú škvrny, pred odumieraním často blednú. Medzižilové vädnutie má mazľavý vodou nasiaknutý vzhľad. Odumierajúce tkanivo má často svetložlté okraje. Rastliny nemusia byť mŕtve; čím dlhšie je obdobie, kým sa začínajú objavovať symptómy, tým vyššia je možnosť prežitia. Rastliny môžu infekciu prekonať. Mladšie rastliny baklažánu sú aj voči menším populáciám *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* oveľa citlivejšie ako staršie rastliny, preto sa odporúča použiť rastliny pred dosiahnutím rastovej fázy tretieho pravého listu.

Vädnutie môže byť taktiež vyvolané aj populáciami iných baktérií či húb, ktoré sú v pletivách hľúz zemiaka prítomné. Patri medzi ne *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* a *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, *Phoma exigua* var. *foveata*, ako aj populáciami saprofytických baktérií. Predovšetkým *Erwinia chrysanthemi* môže spôsobiť symptómy na listoch a vädnutie, ktoré je veľmi podobné symptómom baktériovej krúžkovitosti. Jediný rozdiel spočíva v scernaní stoniek pri infekciách *Erwinia chrysanthemi*. Ďalšie vädnutie sa od vädnutia spôsobeného *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* dá odlišiť, pretože dochádza k rýchlemu vädnutiu celých listov alebo celých rastlín. Rovnako možno pripraviť farbenie podľa Grama: týmto testom sa odliší baktériová krúžkovitosť od *Erwinia* spp.
- 7.9. Hneď ako sa začnú prejavovať symptómy na rastlinách baklažánu, mala by sa zabezpečiť opätovná izolácia pomocou častí zvädnutého listového tkaniva alebo tkaniva stonky z rastlín (bod 3.1.3 v súvislosti s maceráciou). Povrch listov a stoniek baklažánu sa dezinfikuje potretím 70-percentným etanolom. Uskutoční sa test IF alebo test PCR z macerátu rastliny baklažánu a z neho sa izoluje patogén na vhodnom (selektívnom) médiu (bod 8). Rovnako sa môže pripraviť farbenie podľa Grama (dodatok 9). Identifikujú sa čisté kultúry predpokladanej *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* a potvrdí sa patogenita (body 9 a 10).
- 7.10. Za určitých podmienok, najmä keď rastové podmienky nie sú optimálne, môže baktériová krúžkovitosť v rastlinách baklažánu prežívať v podobe latentnej infekcie až štyri týždne po naočkovaní. Ak sa po štyroch týždňoch nepozorujú žiadne symptómy, uskutočnia sa IF/PCR testy na zmiešanej vzorke z centimetrových častí stonky každej testovanej rastliny, ktoré sa odoberú nad miestom očkovania. Ak je test pozitívny, mala by sa zabezpečiť opätovná izolácia na vhodnom (selektívnom) médiu podľa postupu v bode 8. Identifikujú sa čisté kultúry predpokladanej baktériovej krúžkovitosti a potvrdí sa patogenita (body 9 a 10).

Vyhodnotenie výsledkov biotestu:

Platné výsledky biotestu sa získajú, ak sa na rastlinách s pozitívnou kontrolou prejavujú typické symptómy, baktériu možno opätovne izolovať z týchto rastlín a neprejavujú sa žiadne symptómy pri negatívnych kontrolách.

Biotest je negatívny, ak testované rastliny nie sú infikované baktériovou krúžkovitosťou a pod podmienkou, že baktériová krúžkovitosť sa zistí pri pozitívnych kontrolách.

Biotest je pozitívny, ak sú testované rastliny infikované baktériou baktériovej krúžkovitosti.

8. IZOLÁCIA *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*

Diagnóza je kompletná len vtedy, ak je baktéria *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* izolovaná, následne identifikovaná (bod 9) a jej prítomnosť potvrdená testom patogenity (bod 10). Hoci je baktériová krúžkovitosť citlivým organizmom, možno ju izolovať z pletív vykazujúcich príznaky infekcie.

Môžu ju však prerásť rýchloraštie saprofytické baktérie, a preto sú priame izolácie z peletu pochádzajúceho z hlúz zemiaka alebo stonkového tkaniva (bod 3.1.6 alebo 3.2.5) zložité. Priamu izoláciu baktériovej krúžkovitosti možno uskutočniť pomocou selektívneho média a primeraného riedenia resuspendovaného peletu z výrezkov pupkových koncov alebo stoniek zemiakov.

Uskutočnia sa izolácie zo všetkých symptomatických zemiakových hlúz alebo častí stoniek a z rastlín baklažánu, pri ktorých sa neprejavili žiadne symptómy, ale test IF/PCR zo zmiešanej vzorky bol pozitívny (bod 7.10). Ak je to potrebné, možno maceráciu stoniek rastlín baklažánu vykonať podľa postupov uvedených v bode 3.1.3.

Ako pozitívne kontroly sa pripraví decimálne riedenia zo suspenzie s 10^6 cfu baktériovej krúžkovitosti na 1 ml (napr. NCPPB 4053 alebo PD 406). Aby sa vylúčila akákoľvek možnosť kontaminácie, pozitívne kontroly sa pripraví úplne oddelene od vzoriek určených na testovanie.

Pre každú novopripravenú dávku selektívneho média by sa mala jeho vhodnosť pre rast patogénu otestovať predtým, ako sa použije na testovanie bežných vzoriek.

Kontrolný materiál sa otestuje rovnakým spôsobom ako pri vzorke.

8.1. Selektívny platňový rozter

8.1.1. Zo 100 μ l alikvotného podielu vzorky resuspendovaného rajčiakového peletu alebo miazgy baklažánu sa pripraví desaťnásobné riedenia v peletovom pufri (dodatok 3).

8.1.2. Izolácia z neriedeného peletu obyčajne nie je úspešná z dôvodu vysokých rastových požiadaviek baktériovej krúžkovitosti a konkurenčného pôsobenia saprofytov. Keďže baktéria je obyčajne prítomná v rozsiahlych populáciách v infikovaných tkanivách, saprofyty sa obyčajne môžu riedením odstrániť, zatiaľ čo patogén zostáva. Preto sa odporúča vytvoriť riedenia 1/100 až 1/10000 zo 100 μ l každej zo vzoriek a tie naočkovať na médium MTNA alebo médium NCP-88 (dodatok 5) (pri použití Petriho misiek s priemerom 90 mm, pre misky s alternatívnou veľkosťou upravte množstvo), pomocou nanášačiek (hokejkového tvaru) a techniky platňového nanášania.

Alternatívna stratégia spočíva v nanesení počiatočného alikvotného podielu 100 μ l zemiakového peletu na prvú platničku s agarom pomocou nanášačky a potom presunúť nanášačku na druhú platničku s agarom, rozptýliť akýkoľvek zvyšok z nanášačky; nakoniec zopakovať tento postup pri tretej platničke, a tak zabezpečiť efekt riedenia na platničke pomocou nanášačky.

8.1.3. Platničky sa inkubujú na tmavom mieste pri teplote 21 až 23 °C.

8.1.4. Počiatočné preskúmanie platničiek vrátane platničiek s pozitívnou kontrolou a vyhodnotenie rastu pravdepodobne tvoriacich sa kolónií baktériovej krúžkovitosti sa začne po troch dňoch a následne sa vyhodnocuje rast kolónií po piatich, siedmich alebo desiatich dňoch.

8.2. Čistenie podozrivých kolónií

Preočkovávanie pravdepodobne tvoriacich sa kolónií *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* by malo prebiehať na médiách YGM pri naočkovaní rastlín baklažánu a/alebo následnej identifikácii; malo by sa tak urobiť predtým, ako sa začne na platničkách prejavovať intenzívny rast, t. j. najlepšie po troch až piatich dňoch.

8.2.1. Kolónie s pravdepodobnou *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* sa naočkujú na jedno z nasledujúcich živných médií (vzorce sú uvedené v dodatku 5):

- živný dextrózový agar (len pre subkultúry),
- kvasnicovo-glukózový peptónový agar,
- kvasnicový agar s výluhom minerálnych solí.

Počas až desiatich dní sa inkubuje pri teplote 21 až 24 °C.

Baktériová krúžkovitosť rastie pomaly, zvyčajne v priebehu desiatich dní vytvára bodové, smotanovo sfarbené a kupolovité kolónie.

8.2.2. Kultúra sa opätovným rozterom prečistí.

Subkultúrou možno rýchlosť rastu zlepšiť. Typické kolónie sú smotanovo až slonovinovobielo sfarbené, výnimočne žlté, okrúhle, na povrchu hladké, kupolovito vyhnuté, majú hubovo-roztekavú konzistenciu s uceleným okrajom a zvyčajne majú priemer od 1 do 3 mm.

Jednoduché farbenie podľa Grama (dodatok 9) môže pomôcť pri výbere kolónii na ďalšie testovanie.

8.2.3 Identifikujú sa predpokladané bakteriálne kultúry (bod 9) a uskutočnia sa test patogenity (bod 10).

9. IDENTIFIKÁCIA

Pomocou najmenej dvoch z nasledujúcich testov založených na rozličných biologických princípoch sa identifikujú čisté kultúry izolátov podozrivých na prítomnosť bakteriovej krúžkovitosti.

V potrebných prípadoch sa zahrnú pre každý uskutočňovaný test známe referenčné kmene.

9.1. Nutričné a enzymatické identifikačné testy

Určia sa nasledujúce fenotypické vlastnosti, ktoré sú všeobecne prítomné alebo neprítomné v bakteriovej krúžkovitosti, na základe metód podľa Lelliotta a Steada (1987), Klementa a kol. (1990), bez uvedenia autora (1987).

Všetky médiá by sa mali inkubovať pri 21 °C a po šiestich dňoch by sa mali preskúšať. Ak nebudú rásť, inkubujú sa ďalších 20 dní.

Všetky testy musia obsahovať známe kontroly s *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. V nutričných a fyziologických testoch by sa mali použiť očkovacie kultúry zo subkultúr vypestovaných na živných agaroch. Morfológické porovnávanie sa musí vykonávať s kultúrami vypestovanými na živných dextrózových agaroch.

Testy	Očakávaný výsledok
oxidačno-fermentačný test (O/F)	Inertný alebo slabooxidatívny
aktivita oxidázy	-
rast pri 37 °C	-
aktivita ureázy	-
hydrolýza eskulínu	+
hydrolýza škrobu	- alebo slabá
tolerancia 7 % NaCl	-
tvorba indolu	-
katalázová aktivita	+
tvorba H ₂ S	-
využitie citranov	-
skvapalňovanie želatíny	-
kyselina glycerolová	-
kyselina z laktózy	- alebo slabá
kyselina z ramnózy	-
kyselina z glycerínu	-
farbenie podľa Grama (dodatok 9)	+

9.2. Imunofluorescenčný test (IF test)

- Pripraví sa suspenzia s koncentráciou približne 10⁶ buniek na 1 ml tlmivého roztoku IF (dodatok 3).
- Pripraví sa séria dvojnásobného riedenia príslušného antiséra / protilátky.
- Použije sa metóda IF (bod 4).
- Pozitívny test IF sa dosiahne, ak je IF titer bakteriálnej kultúry vzorky ekvivalentný s titrom pozitívnej kontroly.

9.3. Polymerázová reťazová reakcia (test PCR)

- Pripraví sa suspenzia približne 10⁶ buniek na 1 ml tlmivého roztoku.
- Zahreje sa 100 µl bunkovej suspenzie v uzavretých skúmavkách v termobloku alebo vo vodnom kúpeli pri teplote 100 °C na 4 minúty. Ak je to potrebné, pomôcť môže prídanie čerstvo pripraveného NaOH s koneč-

nou koncentráciou 0,05 M na získanie bunkového lyzátu. Vzorky sa môžu následne uložiť pri teplote -16 až -24 °C, až kým nebudú potrebné.

- c) Aplikujú sa vhodné postupy PCR na amplifikáciu *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* špecifických produktov PCR (napr. Pastrik, 2000; pozri dodatok 4; Li a de Boer, 1995; Mills a kol., 1997; Pastrik a Rainey, 1999; Schaad a kol., 1999).
- d) Pozitívna identifikácia *Clavibacter michiganensis* ssp. *Sepedonicus* sa dosiahne, ak majú produkty PCR rovnakú veľkosť a zhodný restriktčný profil, ako má pozitívna kontrola z referenčného kmeňa.

9.4. Fluorescenčná hybridizácia in situ (test FISH)

- a) Pripraví sa suspenzia približne 10^6 buniek na 1 ml UPW.
- b) Použije sa metóda FISH (bod 5).
- c) Pozitívny test FISH sa dosiahne, ak sa rovnaké reakcie dosiahnu pri kultúre aj pri pozitívnej kontrole.

9.5. Profilovanie mastných kyselín (FAP)

- a) Kultúra sa pestuje na tryptikázovom sójovom agare (Oxoid) 72 hodín pri teplote 21 °C.
- b) Uskutočnia sa príslušné postupy FAP (Janse, 1991; Stead, 1992).
- c) Pozitívny test FAP sa dosiahne, ak je profil predpokladanej kultúry totožný s profilom pozitívnej kontroly. Prítomnosť charakteristických mastných kyselín je 15:1 Anteiso A, 15:0 Iso, 15:0 Anteiso, 16:0 Iso, 16:0 a 17:0 Anteiso je vysoko indikačná pre baktériovú krúžkovitosť. Ostatné rody ako *Curtobacterium*, *Arthrobacter* a *Micrococcus* tiež obsahujú niektoré z týchto kyselín, ale 15:1 Anteiso A je vzácna v týchto baktériách, ale vyskytuje sa u všetkých *Clavibacter* spp. na úrovni medzi 1 až 5 %. V baktériovej krúžkovitosti je hodnota obvyčajne okolo 5 %.

9.6. BOX-PCR

- a) Pripraví sa suspenzia približne 10^6 buniek na 1 ml UPW.
- b) Tento test sa aplikuje podľa daného postupu (Smith et al., 2001).

10. POTVRDZOVACÍ TEST

Test patogenity sa musí vykonať ako konečné potvrdenie diagnózy *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* a pre zhodnotenie virulencie kultúr identifikovaných ako *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

- 10.1. Pripraví sa očkovaacia látka približne z 10^6 buniek na 1 ml peletového tlmivého roztoku z trojdňových kultúr z izolátu, ktorý sa má testovať, ako aj vhodnú pozitívnu kontrolu kmeňa *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.
- 10.2. Naočkuje sa päť až desať stoniek baklažánu mladých semenáčov v rastovej fáze tretieho pravého listu (bod 7.3 alebo 7.4).
- 10.3. Inkubuje sa pri teplote 18 – 24 °C pri dostatočnom svetle a relatívne vysokej vlhkosti s dostatočným zavlažovaním, aby sa predišlo stresu z podmokania alebo sucha (bod 7.7) Pri čistých kultúrach by sa typické vädnutie malo získať do dvoch týždňov, ale rastliny, ktoré nebudú po tomto období preukazovať symptómy (bod 7.8), by sa mali inkubovať až do troch týždňov pri teplotách prosievajúcich rastu baklažánov, ale nepresahujúcich teplotu 25 °C (dodatok 8). Ak sa po troch týždňoch príznaky tohto ochorenia neprejavajú, kultúra sa nemôže potvrdiť ako patogénna forma *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.
- 10.4. Odstránením sa izoluje zo symptomických rastlín časť stonky asi 2 cm nad bodom očkovania. Pokračuje sa a rozptýli sa v malom množstve sterilnej destilovanej vody alebo 50 mM fosfátového tlmivého roztoku (dodatok 3). Patogén sa izoluje zo suspenzie nanášaním niekoľkých riedení na živnú pôdu MTNA a YPGA (dodatok 5), inkubuje sa po dobu troch až piatich dní pri teplote 21 až 23 °C a pozoruje sa tvorba kolónií typických pre *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

Dodatok 1

Laboratóriá zapojené do optimalizácie a validácie protokolov

Laboratórium	Miesto	Krajina
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Viedeň a Linz	Rakúsko
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Belgicko
Plantedirektoratet	Lyngby	Dánsko
Central Science Laboratory	York	Anglicko
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburg	Škótsko
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	Francúzsko
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Francúzsko

Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Nemecko
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Nemecko
State Laboratory	Dublin	Írsko
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Holandsko
Norwegian Crop Research Institute, Plant Protection Centre	Aas	Nórsko
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lisabon	Portugalsko
Nacionalni institut za biologijo	Ľublana	Slovinsko
Centro de Diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	Španielsko

Dodatok 2

Príprava pozitívnych a negatívnych kontrol pre skríningové testy výrezkov v PCR/IF a FISH

Vyrobí sa 72-hodinová kultúra virulentného kmeňa *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (NCPPB 4053 alebo PD 406) na základnom médiu SMSA a resuspenduje sa v 10 mM fosforečnanovom tlmivom roztoku, aby sa dosiahla koncentrácia buniek približne 2×10^8 na 1 ml. To sa obyčajne dosiahne pomocou slabo zakalenej suspenzie, ktorá je ekvivalentná s optickou denzitou 0,20 pri 600 nm.

Odstránia sa kuželovité výrezky pupkových koncov z 200 hlúz pochádzajúcich z produkcie odrody s bielou šupkou, o ktorej je známe, že neobsahuje *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

Pupkové konce sa upravujú ako obyčajne a pelet sa resuspenduje v 10 ml peletového tlmivého roztoku.

Prípraví sa desať sterilných 1,5 ml mikroskúmaviek s 900 µl resuspendovaného peletu.

Umiestni sa 100 µl suspenzie *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* do prvej mikroskúmavky a pretrepe sa.

Vytvoria sa decimálne úrovne kontaminácie pomocou ďalšieho riedenia v ďalších piatich mikroskúmavkách.

Šesť kontaminovaných mikroskúmaviek sa použije ako pozitívne kontroly. Štyri nekontaminované mikroskúmavky sa použijú ako negatívne kontroly. Mikroskúmavky sa príslušne označia.

Prípraví sa alikvotný podiel 100 µl v sterilných mikroskúmavkách s objemom 1,5 ml a získa sa tak deväť replík každej kontrolnej vzorky. Uskladnia sa pri teplote -16 až -24 °C až do použitia.

Prítomnosť a kvantifikácia *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* v kontrolných vzorkách by sa mala najskôr potvrdiť pomocou testu IF.

Pre test PCR sa uskutoční extrakcia DNA zo vzoriek pozitívnej a negatívnej kontroly pre každú sériu testovaných vzoriek.

Pre testy IF a FISH sa uskutočnia skúšky na vzorkách pozitívnej a negatívnej kontroly pri každej sérii testovaných vzoriek.

Pri skúškach IF, FISH a PCR sa *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* musí identifikovať v kultúrach najmenej 10^6 a 10^4 buniek/ml pozitívnych kontrol a nesmie byť v žiadnej negatívnej kontrole.

Dodatok 3

Tlmivé roztoky pre testovacie postupy

VŠEOBECNÉ PRAVIDLO: Neotvorené sterilizované tlmivé roztoky sa môžu skladovať až jeden rok.

1. Tlmivé roztoky na extrakciu

1.1. Extrakčný tlmivý roztok (50 mM fosfátový tlmivý roztok, pH 7,0)

Tento tlmivý roztok sa používa na extrakciu baktérie z rastlinného tkaniva pomocou homogenizácie alebo pretrepaním.

Na ₂ HPO ₄ (bezvodný)	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
Destilovaná voda	1,00 l

Rozpustia sa prísady, skontroluje sa pH a sterilizuje sa v autokláve pri 121 °C počas 15 minút.

Dodatočné zložky môžu byť užitočné nasledujúcim spôsobom:

	Účel	Množstvo (na L)
vložky Lubrol	antivločkovací prípravok*)	0,5 g
DC silicone antifoam (protipenový prípravok)	protipenové činidlo*)	1,0 ml
tetrasodium pyrofosfát	Antioxidant	1,0 g
polyvinylpyrrolidon-40000 (PVP-40)	viazanie inhibítorov PCR	50 g

*) Na použitie pri homogenizačnej extrakčnej metóde.

1.2. Peletový tlmivý roztok (10 mM fosfátový tlmivý roztok, pH 7,2)

Tento tlmivý roztok sa používa pri resuspendovaní a riedení extraktov výrezkov pupkových koncov zemiakových hlúz podľa koncentrácie do peletu pomocou odstredovania.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2,7 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,4 g
destilovaná voda	1,00 l

Rozpustia sa prísady, skontroluje sa pH a sterilizuje sa v autokláve pri 121 °C počas 15 minút.

2. Tlmivé roztoky pre test IF

2.1. Tlmivý roztok IF [10 mM fosfátový tlmivý roztok NaCl (PBS), pH 7,2]

Tento tlmivý roztok sa používa na riedenie protilátok.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2,7 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,4 g
NaCl	8,0 g
destilovaná voda	1,0 l

Rozpustia sa prísady, skontroluje sa pH a sterilizuje sa v autokláve pri 121 °C počas 15 minút.

2.2. Tlmivý roztok IF-tween

Tento tlmivý roztok sa používa na premývanie podložných sklíčok.

Pridáme 0,1 % tween 20 do tlmivého roztoku IF.

2.3. Glycerín tlmivý fosfátom, pH 7,6

Tento tlmivý roztok sa používa ako krycia kvapalina v jamkách podložných sklíčok IF na podporu fluorescencie.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	3,2 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,15 g
glycerín	50 ml
destilovaná voda	100 ml

Roztoky krycej kvapaliny sú komerčne dostupné napríklad vo Vectashield® (Vector Laboratories) alebo Citifluor® (Leica).

Dodatok 4

Určovanie stupňa kontaminácie pri testoch IF a FISH

1. Vypočíta sa priemerný počet typických fluoreskujúcich buniek na zorné pole (c).
2. Vypočíta sa počet typických fluoreskujúcich buniek v jamke mikroskopického sklíčka (C)

$$C = c \times S/s$$

kde S = povrchová plocha poľa viacjamkového podložného sklíčka
s = povrchová plocha poľa objektívu:

$$s = \frac{d^2}{4G^2K^2}$$

kde I = koeficient poľa (v rozsahu 8 až 24 v závislosti od optického typu)
K = tubusový koeficient (1 alebo 1,25)
G = zväčšenie objektívu (100x, 40x atď.)

3. Vypočíta sa počet typických fluoreskujúcich buniek na 1 ml resuspendovaného peletu (N).

$$N = C \times 1000/y \times F$$

kde y = množstvo resuspendovaného peletu na každom poli a
F = dilučný faktor resuspendovaného peletu.

Dodatok 5

Médiá na izoláciu a kultiváciu *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

a) Všeobecné médiá rastu

živný agar (NA)	
živný agar (Difco)	23,0 g
destilovaná voda	1,0 l

Rozpusťia sa prísady a sterilizuje sa v autokláve pri 121 °C počas 15 minút.

Živný dextrózový agar (NDA)

Živný agar Difco bacto s obsahom 1 % monohydrátu D(+) glukózy. Sterilizuje sa v autokláve pri 115 °C počas 20 minút.

Kvasnicovo-peptónovo-glukózový agar (YPGA)

kvasnicový extract (Difco)	5,0 g
Peptón bacto (Difco)	5,0 g
monohydrát D(+) glukózy	10,0 g
Bacto-agar (Difco)	15,0 g
destilovaná voda	1,0 l

Rozpusťia sa prísady a sterilizuje sa v autokláve pri 121 °C počas 15 minút.

Kvasnicový výluh s obsahom minerálnych solí (YGM)

kvasnicový extract (Difco)	2,0 g
monohydrát D(+) glukózy	2,5 g
K ₂ HPO ₄	0,25 g
KH ₂ PO ₄	0,25 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g

MnSO ₄ ·H ₂ O	0,015 g
NaCl	0,05 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,005 g
Bacto-agar (Difco)	18 g
Destilovaná voda	1,0 l

V autokláve sa 20 minút sterilizuje 0,5 l celkového objemu média pri 115 °C.

b) Validované selektívne médiá rastu

Médium MTNA

Ak sa neuvádza inak, všetky zložky média pochádzajú z BDH

kvasnicový extract (Difco)	2,0 g
manitol	2,5 g
K ₂ HPO ₄	0,25 g
KH ₂ PO ₄	0,25 g
NaCl	0,05 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,015 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,005 g
agar (oxid č. 1)	16,0 g
destilovaná voda	1,0 l

Rozpustia sa prísady, ustáli sa hodnota pH na 7,2. Po sterilizovaní v autokláve (pri teplote 121 °C počas 15 minút) sa ochladí na 50 °C, pridajú sa antibiotiká: trimetoprim 0,06 g, kyselina nalidixínová 0,002 g, amfotericín B 0,01 g.

Zásobné antibiotické roztoky: trimetoprim (Sigma) a kyselina nalidixínová (Sigma) (obidva po 5 mg/ml), v 96 % metanole, amfotericín B (Sigma) (1 mg/ml) v dimethyl sulfoxide. Zásobné roztoky sa sterilizujú cez filter.

Doba použiteľnosti základného média je tri mesiace. Po pridaní antibiotík je doba trvania použiteľnosti jeden mesiac pri skladovaní v chlade.

Médium NCP-88

živný agar (Difco)	23 g
kvasnicový extract (Difco)	2 g
D-manitol	5 g
K ₂ HPO ₄	2 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g
destilovaná voda	1,0 l

Rozpustia sa prísady, ustáli sa hodnota pH na 7,2. Po sterilizovaní v autokláve a ochladiení na 50 °C sa pridajú tieto antibiotiká: polymyxín B sulfát (Sigma) 0,003 g, kyselina nalidixínová (Sigma) 0,008 g, cycloheximid (Sigma) 0,2 g.

Antibiotiká sa rozpustia v zásobných roztokoch takto: kyselina nalidixínová v 0,01 M NaOH, cykloheximid v 50 % etanole, polymyxín B sulfát v destilovanej vode. Zásobné roztoky sa sterilizujú cez filter.

Doba použiteľnosti základného média je tri mesiace. Po pridaní antibiotík je doba trvania použiteľnosti jeden mesiac pri skladovaní v chlade.

Dodatok 6

Validované PCR protokoly a činidlá

Predbežné testovanie touto metódou by malo umožniť reprodukovateľné zistenie minimálne 10^3 až 10^4 buniek *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* na 1 ml vzorkového extraktu.

Predbežné testovanie by rovnako nemalo ukázať žiadne nesprávne pozitívne výsledky pre súbor vybraných referenčných bakteriálnych kmeňov.

1. Multiplex PCR s internou kontrolou PCR (Pastrík a kol., 2000)

1.1. Oligonukleotidové primery

forward primer PSA-1	5' – CTC CTT GTG GGG TGG GAA AA – 3'
reverse primer PSA-R	5' – TAC TGA GAT GTT TCA CTT CCC C – 3'
forward primer NS-7-F	5' – GAG GCA ATA ACA GGT CTG TGA TGC – 3'
reverse primer NS-8-R	5' – TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA – 3'

Predpokladaná veľkosť produktu PCR z cieľovej DNA *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* = 502 bp (PSA-primer).

Predpokladaná veľkosť produktu PCR z 18S rRNA internej kontroly PCR = 377 bp (NS-primer).

1.2. Reakčná zmes PCR

Činidlo	Množstvo na reakciu	Konečná koncentrácia
sterilné UPW	15,725 ěl	
10xPCR tlm. roztok ¹⁾ (15 mM MgCl ₂)	2,5 ěl	1x (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (frakcia V) (10 %)	0,25 ěl	0,1 %
d-NTP zmes (20 mM)	0,125 ěl	0,1 mM
Primer PSA-1 (10 ěM)	0,5 ěl	0,2 ěM
Primer PSA-R (10 ěM)	0,5 ěl	0,2 ěM
Primer NS-7-F (10 ěM) ²⁾	0,1 ěl	0,04 ěM
Primer NS-8-R (10 ěM) ²⁾	0,1 ěl	0,04 ěM
Taq polymeráza (5U/ ěl) ¹⁾	0,2 ěl	1,0 U
Objem vzorky	5,0 ěl	
Celkový objem	25,0 ěl	

¹⁾ Metódy boli validované pomocou Taq polymerázy od Perkin Elmer (AmpliTag) a Gibco BRL.

²⁾ Koncentrácie primerov NS-7-F a NS-8-R boli optimalizované pre extrakciu výrezkov pupkových koncov zemiakových hlúz pomocou metódy homogenizácie a čistenia DNA podľa Pastríka (2000) (bod 6.1.a.). Reoptimalizácia koncentrácií činidiel sa bude vyžadovať, ak sa použije extrakcia potrepaním alebo iné metódy izolácie DNA.

1.3. Reakčné podmienky PCR

Spustí sa nasledujúci program:

- 1 cyklus: a) tri minúty pri teplote 95 °C (denaturácia cieľovej DNA)
- 10 cyklov: b) jedna minúta pri teplote 95 °C (denaturácia cieľovej DNA)
 c) jedna minúta pri teplote 64 °C (pripájanie primerov)
 d) jedna minúta pri teplote 72 °C (predlžovanie kópie)

- 25 cyklov: e) 30 sekúnd pri teplote 95 °C (denaturácia cieľovej DNA)
 f) 30 sekúnd pri teplote 62 °C (prípájanie primerov)
 g) jedna minúta pri teplote 72 °C (predlžovanie kópie)
- 1 cyklus: h) päť minút pri teplote 72 °C (konečné predĺženie)
 i) držať pri teplote 4 °C

Tento program je optimalizovaný na použitie s termocyklérom MJ Research PTC 200. Zmena v trvaní krokov cyklov b) až g) sa môže vyžadovať pri použití iných modelov.

1.4. Restričná analýza produktu PCR

Produkty PCR amplifikované z DNA *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* sa štiepia restričnou endonukleázou Bgl II pri teplote 37 °C počas 30 minút. Vzniknuté fragmenty získané zo špecifického PCR produktu pre *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* majú veľkosti 282 bp a 220 bp.

2. Príprava nanášacieho tlmivého roztoku

2.1. Bromfenolová modrá (10 %-zásobný roztok)

bromfenolová modrá	5 g
destilovaná voda (bidest)	50 ml

2.2. Nanášací tlmivý roztok

glycerín (86 %)	3,5 ml
bromfenolová modrá (2.1)	300 µl
destilovaná voda (redest)	6,2 ml

3. 10x Tris acetát EDTA (TAE) tlmivý roztok, pH 8,0

Tris	48,4 g
Ľadová kyselina octová	11,42 ml
EDTA (disodná soľ)	3,72 g
Destilovaná voda	1,00 l

Zriedi sa na 1x pred použitím.

Tiež komerčne dostupný (napr. Invitrogen alebo ekvivalent).

Dodatok 7

Validované reagensie pre test FISH

1. Oligopróby

CMS-špecifická próba baktériovej krúžkovitosti CY3-01	5' - TTG CGG GGC GCA CAT CTC TGC ACG - 3'
Nešpecifická eubakteriálna próba EUB-338-FITC	5' - GCT GCC TCC CGT AGG AGT - 3'

2. Fixatívny roztok

Fixatívum obsahuje paraformaldehyd, ktorý má toxické účinky, preto je nevyhnutné nasadiť si rukavice a nevdychovať. Odporúča sa pracovať v digestore.

- a) Zahreje sa 9 ml vody molekulárneho gradienta (napr. ultra čistá voda (UČW) na teplotu asi 60 °C a pridá sa 0,4 g paraformaldehydu. Paraformaldehyd sa rozpúšťa po pridaní piatich kvapiek 1N NaOH a miešaním magnetickým miešadlom.
- b) Upraví sa pH na 7,0 pridaním 1 ml 0,1M fosfátového tlmivého roztoku (PB; pH 7,0) a piatich kvapiek 1N HCl. Skontroluje sa pH pomocou indikačných pásov a podľa potreby sa upraví pomocou HCl alebo NaOH.

V roztokoch s paraformaldehydom sa nepoužíva pH-meter.

c) Roztok sa prefiltruje cez 0,22 µm membránový filter, zamedzí sa prístupu prachu a uloží sa pri teplote 4 °C na ďalšie použitie.

Alternatívny fixačný roztok: 96 % etanol.

3. 3x Hybmix

NaCl	2,7 M
Tris-HCl	60 mM (pH 7,4)
EDTA (sterilizované cez filter a v autokláve)	15 mM

Zriedi sa na 1x, ako sa vyžaduje.

4. Hybridizačný roztok

1x Hybmix	
Sódium dodecyl sulfát (SDS)	0,01 %
probe EUB 338	5 ng/ěl
próba CMSCY301	5 ng/ěl

Množstvá hybridizačného roztoku sa pripravujú na základe výpočtov v tabuľke. Pre každé podložné sklíčko (obsahujúce dve rôzne vzorky dvojmo) treba 90 ěl hybridizačného roztoku.

Tabuľka: Navrhované množstvá na prípravu hybridizačnej zmesi.

	2 podložné sklíčka	8 podložných sklíčok
sterilná UPW	50,1	200,4
3x hybmix	30,0	120,0
1 % SDS	0,9	3,6
próba EUB 338 (100 ng/ěl)	4,5	18,0
próba CMSCY301 (100 ng/ ěl)	4,5	18,0
celkový objem (ěl)	90,0	360,0

Všetky roztoky, ktoré obsahujú oligopróby citlivé na svetlo, sa skladujú na tmavom mieste pri teplote -20 °C. Počas používania sa chránia pred priamym slnečným svetlom a elektrickým svetlom.

5. 0,1M fosforečnanový tlmivý roztok, pH 7,0

Na ₂ HPO ₄	8,52 g
KH ₂ PO ₄	5,44 g
destilovaná voda	1,00 l

Rozpustia sa prísady, skontroluje sa pH a sterilizuje sa v autokláve pri 121 °C počas 15 minút.

Dodatok 8

Kultivácia rastlín baklažánu

Osivo baklažánu (*Solanum melongena*) sa vyseje do pasterizovaného kompostu. Semenáče s plne vyvinutými kľúčnymi listami (10 až 14 dní staré) sa presadia do kvetináčov s pasterizovaným kompostom.

Baklažány by sa mali pestovať v skleníkoch pri zachovaní nasledujúcich klimatických podmienok:

Dĺžka dňa: 14 hodín alebo prirodzená dĺžka dňa, ak je väčšia
Teplota: deň: 21 až 24 °C
noc: 15 °C

Vnímové odrody baklažánu: „Black Beauty“
„Long Tom“
„Rima“
„Balsas“

Dodatok 9

Postup pre farbenie podľa Grama (upravené podľa Huckera) (Doetsch, 1981) ¹⁾

Roztok kryštálovej violete

V 20 ml 96-percentného etanolu sa rozpustia 2 g kryštálovej violete.
V 80 ml destilovanej vody sa rozpustí 0,8 g oxalátu amónneho.
Obidva roztoky sa zmiešajú.

Jódová tinktúra podľa Lugola

jód	1 g
jodid draselný	2 g
destilovaná voda	300 ml

Obidve pevné chemikálie sa zmiešajú, spolu sa rozotrujú v tretej miske. Pridajú sa do destilovanej vody, nádoba sa uzavrie a premieša sa.

Safranínový odfarbovací roztok

Zásobný roztok:

safranín O	2,5 g
96 % etanol	100 ml

Zmes sa premieša a odloží sa.

Zriedi sa v pomere 1:10 na pracovnú koncentráciu.

Postup pri farbení

1. Pripraví sa rozter, fixuje sa sušením na vzduchu a teplom.
2. Podložné skličko sa zaleje roztokom kryštálovej violete na jednu minútu.
3. Krátko sa umýva pod tečúcou vodou z vodovodu.
4. Na minútu sa zaleje jódovou tinktúrou podľa Lugola.
5. Opäť sa umyje pod tečúcou vodou a osuší sa pijavým papierom.
6. Odfarbuje sa buď kvapkaním 96-percentného etanolu až dovedy, kým sa nevyučuje farbivo, alebo ponorením a miernym miešaním v ňom počas 30 sekúnd.
7. Umyje sa pod tečúcou vodou a osuší sa pijavým papierom.
8. Na desať sekúnd sa zaleje safranínom.
9. Opäť sa umyje pod tečúcou vodou a osuší sa pijavým papierom.

Gram pozitívne baktérie majú fialovo-modré, Gram negatívne baktérie ružovo-červené sfarbenie.

¹⁾ Tiež možno použiť komerčne dostupné roztoky a farbiace súpravy.

Časť B

1. Pri každom podozrivom výskyte získanom z výsledkov skríningového testu, vykonaného podľa postupu v časti A, pri ktorých sa očakáva potvrdenie alebo vyvrátenie tvrdenia po dokončení postupu, sa do dokončenia tohto postupu musia uchovať alebo primerane zakonzervovať
– všetky hľuzy zemiakov a ak je to možné všetky testované rastliny,

- všetky zostávajúce extrakty a dodatočný pripravený materiál pre skríningové testy, napr. imunofluorescenčné podložné sklička, a
- celá príslušná dokumentácia.

Zadržanie zemiakových hlúz umožní v potrebných prípadoch uskutočniť rôzne testy.

2. Pri pozitívnom potvrdení baktérievej krúžkovitosti by sa mali počas minimálne jedného mesiaca po oznámení postupu podľa § 4 ods. 2 zadržať alebo primeraným spôsobom zachovať
 - materiály uvedené v bode 1,
 - vzorka infikovaných rastlín baklažánu naočkovaných extraktom z hlúz alebo rastlín, a
 - izolovaná kultúra baktérievej krúžkovitosti.